

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-124171- -00000-0000

Fecha: 2012-07-24 16:58:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **“IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES
MOLECULARES ASOCIADOS CON COMPOSICIÓN DE
ÁCIDO GRASO EN PLANTAS”**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C12Q 1/68**

71. SOLICITANTE **MALAYSIAN PALM OIL BOARD**

DOMICILIO **KAJANG, ESTADO DE SELANGOR,
MALASIA**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **24 JUL 2012**

(FORMA P 10)



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 12-124171- -00000-0000

Fecha: 2012-07-24 16:58:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

DIRECCIÓN
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II	
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)			
Solicitud Internacional No.		PCT/MY2011/000003	Fecha 07/01/11	
Publicación Internacional No.		WO 2011/084047 A3	Fecha 14/07/11	
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCION:			
"IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS CON COMPOSICIÓN DE ÁCIDO GRASO EN PLANTAS"				
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP			
C12Q 1/68				
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO	
MALAYSIAN PALM OIL BOARD				
6	DATOS DEL SOLICITANTE			
DIRECCIÓN		6, Persiaran Institutsi, Bandar Baru Bangi, 43000 Kajang, Selangor, Malasia	No. TELÉFONO 3264270	
CIUDAD		Kajang	E-MAIL jllcco@lloredacamacho.com	
DEPARTAMENTO/ESTADO		Selangor	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
PAÍS DE RESIDENCIA		Malasia		
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD	
1.	HARMINDER SINGH	Rajinder Singh	Malasia	
2.	CHEAH	Suan Choo		
3.	ABD. RAHMAN	Rahimah		
4.	OOI	Cheng Li, Leslie		
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: jllcco@lloredacamacho.com				
8	DATOS INVENTOR (ES)			
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD DIRECCIÓN	
1.	Malasia	Selangor	Kajang	c/o Malaysiona Palm Oil Board, 6, Persiaran Institutsi, Bandar Baru Bangi, 43000 Kajang, Selangor, Malasia
2.				
3.				
4.				
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)				
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.				
9	(74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO			
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN	
LLOREDA RICAURTE		ALICIA	C.C 39.690.713 T.P.53.215	
DIRECCIÓN		Calle 72 No 5-83 Piso 5to	No. TELÉFONO 3264270	
CIUDAD		Bogotá	E-MAIL jllcco@lloredacamacho.com	
PAÍS		Colombia	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Malasia		MY	PI2010000118	10/01/11
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro	
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.			☐ Hoja de información complementaria.	
			☐ Otros, especificar	
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de Internet.				
COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO		N°	12-0064206	Fecha Junio 25, 2012
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el peticionario)				
 ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante C.C 39.690.713 T.P. 53.215 Apoderada				
16	ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica		Documentación Jurídica		
Solicitud Internacional en castellano				
1. ☒ Descripción N° de Folios: 48		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 65		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° Folios: 12		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.		
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
8. ☒ Anexo formato digital.		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS CON COMPOSICIÓN DE ÁCIDO GRASO EN PLANTAS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención provee métodos para seleccionar plantas con base en una característica deseada. La invención objeto se relaciona particularmente con métodos para seleccionar plantas con base en el contenido de ácido graso del aceite aislado de la planta.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA PREVIA

La palma de aceite es una cosecha perenne que pertenece al género *Elaeis* y a la familia botánica *Palmae*. El aceite de palma es una forma de un aceite vegetal comestible obtenido del fruto del árbol de palma de aceite. El aceite de palma ahora ha superado al aceite de soya como el aceite vegetal más ampliamente producido en el mundo.

El fruto de palma es la fuente tanto para el aceite de palma (extraído del mesocarpio de la fruta) y el aceite de nuez de palma (extraído de las semillas del fruto).

El aceite de palma es en sí rojizo porque contiene una alta cantidad de betacaroteno. Se usa como aceite de cocina, para preparar margarina y es un componente de muchos alimentos procesados. Su ebullición por pocos minutos destruye los carotenoides y al aceite se vuelve blanco.

El aceite de palma es uno de los pocos aceites vegetales relativamente alto en grasas saturadas (tal como el aceite de coco) y por ende, semi-sólido a temperatura ambiente.

El aceite de palma y el aceite de nuez de palma están compuestos de ácidos grasos esterificados con glicerol justo como cualquier grasa común. Ambos son altos en ácidos grasos saturados. La palma de aceite le da su nombre al ácido palmítico de ácido graso saturado de 16 carbonos encontrado en el aceite de palma; el aceite oléico monosaturado también es un constituyente de aceite de palma mientras que el aceite de nuez de palma contiene principalmente ácido láurico. El aceite de palma es la fuente natural más grande de tocotrienol, parte de la familia de la vitamina E. El aceite de palma también es alto en vitamina K y en magnesio dietético.

La concentración aproximada de ácidos grasos (FAs) en el aceite de palma es la siguiente:

- Saturados (total: 49.9%)
 - Palmítico C16:0 44.3%
 - Esteárico C18:0 4.6%
 - Mirístico C 14:0 1.0%
- Monosaturados
 - Oléico C18:1 38.7%
- Poliinsaturado
 - Linoléico C18:2 10.5%

Para el aceite de nuez de palma, el contenido de ácido graso es:

- Saturados (total: 82%)
 - Láurico C12:0 48.2%

- Mirístico C14:0 16.2%
- Palmítico C16:0 8.4%
- Cáprico C10:0 3.4%
- Caprílico C8:0 3.3%
- Esteárico C18:0 2.5%
- Monosaturados
 - Oléico C18:1 15.3%
- Poliinsaturados
 - Linoléico C18:2 2.3%

Dentro del género *Elaeis* se distinguen dos especies, la palma de aceite económicamente importante (*Elaeis guineensis*) nativa originalmente de Africa y un familiar Sur Americano, *Elaeis oleifera*.

Morfológicamente, la principal característica de la palma *E. oleifera* que la diferencia de la otra especie comercial, *E. guineensis*, es su tronco procumbente (Corley y Tinker, *The Oil Palm* (4a edición), pp: 287-326, Blackwell Science, 2003). Los frutos individuales de *E. oleifera* son mucho más pequeños que los de *E. guineensis*, y el tamaño del racimo es de aproximadamente 15-20 kg, comparado con aproximadamente 25 kg en promedio para la Deli *E. guineensis* (Latiff, *Advances in Oil Palm Research*, Volumen 1, pp: 19-38, Malaysian Palm Oil Board (MPOB), 2000). En *E. oleifera* hasta el 90% de los frutos tienden a ser de naturareza partenocárpica (Hartley, *The oil palm* (3ª edición), pp: 47-94, Longman, London, 1988), que porta un contenido de aceite mucho menor (Meunier and Boulin, *Oleagineux* 30:5-8, 1975). Como tal, la producción de aceite de *E. oleifera* es mucho menor, con la relación de aceite a racimo de 5%, comparada con la *E. guineensis* (tenera), que es de más del 25% (Rajanaidu *et al.*, In *Advances in Oil Palm Research*, Volumen 1, pp:171-237, Malaysian Palm Oil Board, 2000).

Sin embargo, *E. oleifera* no posee ciertos atributos que son de interés para los cultivadores de la palma de aceite. El incremento de altura anual es solamente de 5-10 cm, menos de un quinto del de *E. guineensis* (Corley y Tinker, *The Oil Palm* (4ª edición), pp: 287-326, Blackwell Science, 2003). La característica de su aceite de mesocarpo es especialmente de interés. El valor de Yodo (IV, que es una medida de insaturación del aceite) del aceite de *E. oleifera* puede alcanzar hasta más de 90, comparado con el aceite de *E. guineensis*, el cual tiene en promedio un IV de 53.3 (Rajanaidu *et al.*, In *Advances in Oil Palm Research*, Volumen 1, pp: 171-237, Malaysian Palm Oil Board, 2000). La composición de ácido graso es también única, como el aceite de *E. oleifera* tiene niveles altos de ácido oléico y linoléico y menores niveles del ácido palmítico y otros ácidos grasos saturados, dándole una propiedad bastante similar en composición al aceite de oliva. El interés en la *E. oleifera* también fue alimentada por el hecho que este mostró Resistencia a la enfermedad de putrefacción de brotes florales en Colombia y su posible adaptación a un clima con una estación seca extrema (Hartley, *The oil palm* (3ª edición), pp: 47-94, Longman, Londres, 1988).

Se propuso un programa híbrido interespecífico de *E. oleifera* x *E. guineensis* como un método de cultivo para genes de introgresión para el incremento de altura lento, alta instauración de aceite y tolerancia de la enfermedad de la *E. oleifera* en aceite alto que produce la *E. guineensis* (Meunier y Hardon, *Oil Palm Research*, pp:127-138, 1976). En Malasia, uno de los principales objetivos del programa de cultivo de híbrido es mejorar la calidad del aceite. Esta es una estrategia de cultivo a largo plazo, cuyos así resultados obtenidos muestran de lejos que la calidad del aceite, tomada como su contenido de ácido graso insaturado, siendo mejor en los híbridos y en sus retrocruces que en las *E. guineensis* comerciales (Suheimi y Lubis, *Bulletin Pusat Penelitian Marihat* 5:37-44, 1985; Chin *et al*, *Palm Oil International Conference*, Malaysian Palm Oil Board, pp: 36-50, 2003). El cultivo tradicional está jugando un papel

importante para lograr los objetivos del programa de cultivo de híbrido. Sin embargo, está impedido por el largo ciclo de selección (10-12 años) (Oboh y Fakorede, *Oleagineux* 44:509-513, 1989) y los enormes recursos (tierra, mano de obra y manejo del campo) requeridos para los programas de cultivo de palma de aceite. La introducción de las técnicas de selección asistidas por marcadores (MAS – por sus siglas en inglés) en el programa de cultivo de híbrido puede ayudar a acelerar el objetivo de cultivo de aumentar los niveles de ácidos grasos insaturados. Con MAS, es posible la selección en generaciones segregadas de híbridos interespecíficos y sus retrocruces con base en la presencia o ausencia de marcadores moleculares enlazados a la composición de ácido graso.

Los marcadores basados en ADN tales como polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP – por sus siglas en inglés), marcadores de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD – por sus siglas en inglés), polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP – por sus siglas en inglés) y marcadores microsatélite (SSR – por sus siglas en inglés) han sido aplicados a la palma de aceite para investigar la diversidad genética (Shah *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 89:713-718, 1994; Billotte *et al*, *Genome* 44:413-425, 2001), huella genética (Mayes *et al*, *Molecular Breeding* 2:175-180, 1996) y un intento de identificar marcadores para variación somaclonal (Rival *et al*, *Plant Breeding* 117:73-76, 1998; Matthes *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 102:971-979, 2001). Muchos de estos sistemas de marcadores también han sido aplicados al mapeo genético en la palma de aceite. Los marcadores RFLP de librerías genómicas han sido aplicados al mapa de ligamento de la palma de aceite (Mayes *et al*, *Genome* 40:116-122, 1997). El mapa alberga 97 marcadores RFLP en 24 grupos de dos o más y fue generado usando un auto-cruce de *guineensis*. Moretzsohn *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 100:63-70 (2000) reportó el mapeo de ligamento genético para un solo cruce controlado de palma de aceite usando marcadores RAPD y la

estrategia de mapeo de pseudo-cruzamiento de prueba. Más recientemente, Billotte et al, *Theoretical and Applied Genetics* 110:754-765 (2005) reportó un mapa de ligamento de alta densidad basado en SSR para la palma de aceite, que involucra un cruce entre una palma delgada pelada *E. guineensis* (*tenera*) y una palma gruesa pelada *E. guineensis* (*dura*). El mapa consiste de 255 marcadores de microsatélite y 688 AFLPs, representa el primer mapa de ligamento para la palma de aceite que tiene 16 grupos de ligamento independientes que corresponden al cromosoma haploide de número 16 en la palma de aceite (Maria et al, *Elaeis* 7:122-134, 1995). A pesar de las ventajas hechas, y el progreso alcanzado en el mapeo genético de la palma de aceite, solamente un número limitado de rasgos han sido etiquetados a la fecha. Mayes et al., *Genome* 40:116-122 (1997), Moretzsohn et al., *Theoretical and Applied Genetics* 100:63-70 (2000) y Billotte et al., *Theoretical and Applied Genetics* 110:754-765 (2005) reportó la identificación de marcadores RFLP, RAPD y AFLP respectivamente, ligados a los locus de espesor de la vaina. El espesor de vaina es un factor rasgo económico importante que muestra herencia monofactorial, y es la base para la clasificación de las especies *E. guineensis* en tres formas de fruto, dura (vainas gruesas), tenera (vainas delgadas y pisferas (sin vaina)). Sin embargo, la mayoría de los rasgos de interés económico en la palma de aceite exhiben herencia cuantitativa. En esta área, Ranee et al., *Theoretical and Applied Genetics* 103:1302-1310 (2001), la expansión del mapa genético desarrollado por Mayes et al., *Genome* 40:116-122 (1997), reportó la detección de QTLs asociados con los componentes vegetativos y de producción de la palma de aceite. El trabajo reportado anteriormente representa desarrollos importantes en la aplicación de MAS en los programas de cultivo de palma de aceite.

En la presente invención se explotaron sondas de ADN complementario (ADNc) como marcadores RFLP. Los clones de ADNc se encuentran en las regiones expresadas del genoma y representan fragmentos de gen. Su

identidad puede ser determinada mediante secuenciamiento y tales secuencias son conocidas como etiquetas de secuencia expresadas (ESTs). La utilidad de las ESTs como marcadores ha sido demostrada en varias especies de planta (Matthews *et al.*, *Crop Science* 41: 516-521, 2001; Pfaff y Kahl, *Molecular Genetics and Genomics* 269:243-251, 2003). El uso de las sondas de EST ayuda a mapear los genes conocidos así como proveer sondas de anclaje para mapeo comparativo. Adicionalmente, el mapeo de ESTs íntimamente ligadas a o co-segregadas con un rasgo permiten que el gen para ese rasgo sea identificado mediante el enfoque del gen candidato. Además de los marcadores RFLP, también se usaron marcadores AFLP y SSR en el estudio.

Los detalles bibliográficos de las publicaciones referidas en esta descripción también están recopilados el final de la descripción.

La referencia a cualquier técnica previa en esta descripción no es, ni debe tomarse como un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia que esta técnica previa forma parte del conocimiento general común en cualquier país.

RESUMEN DE LA INVENCION

A lo largo de esta descripción, a menos que el contexto lo requiera de otra forma, la palabra "comprende", o variaciones de la misma "comprenden" o "que comprende", serán entendidas que implican la inclusión de un elemento o entero o grupo de elementos o enteros declarados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento o entero o grupo de elementos o enteros.

Las secuencias de nucleotide y amino ácido son referidas mediante un número identificador de secuencia (SEQ ID NO:). Los SEQ ID Nos: corresponden numéricamente a los identificadores de secuencia <400>1 (SEQ ID NO:1), <400>2 (SEQ ID NO:2), etc. En la Tabla A se provee un resument de los

identificadores de secuencia. Se provee un listado de secuencias antes de las reivindicaciones. Las secuencias de cebador de los conjuntos de cebador de microsatélite se proveen en el Adjunto 1.

La presente invención está declarada en parte en la determinación de los marcadores genéticos que permiten que las plantas sean seleccionadas con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de la planta.

En consecuencia, un aspecto de la presente invención provee un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de la planta, el método comprende detectar para la presencia o ausencia de un marcador genético en la planta, el marcador genético correspondiente a una secuencia de nucleótido que tiene al menos 90% de identidad con al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:3, o una secuencia complementaria a este, en donde la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto y la ausencia del marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC insaturado alto.

Otro aspecto de la presente invención está dirigido a un método para detectar seleccionar una planta con base en el FAC del aceite, en donde el marcador genético es CB75A.

En otro aspecto la presente invención está dirigida a un método para seleccionar una planta con base en el FAC del aceite, en donde el ácido graso saturado es seleccionado del grupo que consiste de: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0).

En un aspecto adicional, la presente invención está dirigida a un método para seleccionar una planta con base en el FAC del aceite, en donde el ácido graso

insaturado se selecciona del grupo que consiste de ácido oléico (C18:1), ácido linoléico (C18:2) y ácido alfa-linoléico (C18:3).

La presente invención provee además un método para seleccionar una planta con base en el FAC del aceite, en donde la ausencia del marcador genético es indicativo adicional de una planta que tiene un alto valor de yodo (IV).

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de la planta, el método comprende detectar la presencia o ausencia de un marcador genético en la planta, el marcador genético correspondiente a una secuencia de nucleótido que tiene al menos 90% de identidad para al menos 20 nucleótidos contiguos de SEQ ID NO:56, o una secuencia complementaria a esta, en donde la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto, y la ausencia del marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con FAC insaturado alto.

Otro aspecto de la presente invención está dirigido a un método para seleccionar una planta con base en el FAC del aceite, en donde el marcador genético es RD56.

En un aspecto relacionado, la presente invención está dirigida a un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite, en donde el ácido graso saturado es ácido mirístico.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de la planta, el método comprende detectar la presencia o ausencia de un marcador genético en la planta, el marcador genético

corresponde a una secuencia de nucleótido que tiene al menos 90% de identidad a nucleótidos contiguos de la SEQ ID 65 que es la secuencia cebadora para el conjunto cebador de microsatélite P4T8, como se muestra en la Tabla A y el Adjunto 1, o una secuencia complementaria a esta, en donde la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto y la ausencia del marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC insaturado alto.

Otro aspecto de la invención está dirigido a un método para seleccionar una planta con base en el FAC del aceite, en donde el marcador genético es P4T8.

En un aspecto relacionado, la presente invención está dirigida a un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite, en donde el ácido graso saturado es ácido esteárico (C18:0) y en donde el ácido graso insaturado es ácido palmitoléico (C16:1).

En un aspecto adicional, la presente invención está dirigida a una molécula de ADN asociada con un FAC homólogo o complementario a la molécula de ADN revelada en la SEQ ID NO:3 localizada en un grupo de ligamiento 1 de la población de mapeo de T128, una palma de aceite de la especie *Elaeis guineensis* o progenie de la misma, y es de una longitud suficiente para ser útil como un marcador de ADN para un alelo de un locus de rasgo cuantitativo, en donde el alelo determina el contenido de FAC de una planta.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a una molécula de ADN asociada con FAC homólogo o complementario a la molécula de ADN revelada en la SEQ ID NO:56 localizada en el grupo de ligamiento 12 de la población de mapeo de T128 o progenie del mismo y es de suficiente longitud para ser útil como un marcador de ADN para un alelo de un locus de rasgo cuantitativo, en donde el alelo determina el contenido de FAC de una planta.

En otros aspecto, la presente invención está dirigida a una molécula de ADN asociada con FAC homólogo o complementario a la molécula de ADN revelada en la SEQ ID NO:P4T8 localizada en el grupo de ligamiento 12 de la población de mapeo de T128 o progenie del mismo, y es de una longitud suficiente para ser útil como un marcador de ADN para un alelo de un locus de rasgo cuantitativo, en donde el alelo determina el contenido de FAC de una planta.

Un resumen de los identificadores de secuencia usados a lo largo de la descripción se provee en la Tabla A y el Adjunto 1.

TABLA A
Resumen de Identificadores de Secuencia

ID DE SECUENCIA NO:	DESCRIPCIÓN
1	Secuencia de nucleótido del clon KT35
2	Secuencia de nucleótido del clon SFB88
3	Secuencia de nucleótido del clon CB75A
4	Secuencia de nucleótido del clon SFB23
5	Secuencia de nucleótido del clon G26
6	Secuencia de nucleótido del clon SFB41
7	Secuencia de nucleótido del clon MT87 I
8	Secuencia de nucleótido del clon G37
9	Secuencia de nucleótido del clon SFB31
10	Secuencia de nucleótido del clon MT39
11	Secuencia de nucleótido del clon CA26B
12	Secuencia de nucleótido del clon KT3
13	Secuencia de nucleótido del clon MET16
14	Secuencia de nucleótido del clon KT21

ID DE SECUENCIA NO:	DESCRIPCIÓN
15	Secuencia de nucleótido del clon G224
16	Secuencia de nucleótido del clon MT45
17	Secuencia de nucleótido del clon MET9
18	Secuencia de nucleótido del clon MET41
19	Secuencia de nucleótido del clon SFB95
20	Secuencia de nucleótido del clon MT170
21	Secuencia de nucleótido del clon KT6
22	Secuencia de nucleótido del clon CB46F
23	Secuencia de nucleótido del clon KT41
24	Secuencia de nucleótido del clon MT42
25	Secuencia de nucleótido del clon SFB83
26	Secuencia de nucleótido del clon NS20
27	Secuencia de nucleótido del clon KT30
28	Secuencia de nucleótido del clon G142
29	Secuencia de nucleótido del clon GT8
30	Secuencia de nucleótido del clon SFB99 I
31	Secuencia de nucleótido del clon G188
32	Secuencia de nucleótido del clon SFB54
33	Secuencia de nucleótido del clon SFB130 II
34	Secuencia de nucleótido del clon MT187 II
35	Secuencia de nucleótido del clon CA184 II
36	Secuencia de nucleótido del clon CA184 I
37	Secuencia de nucleótido del clon G80
38	Secuencia de nucleótido del clon CB180A
39	Secuencia de nucleótido del clon G39
40	Secuencia de nucleótido del clon M12
41	Secuencia de nucleótido del clon SFB37
42	Secuencia de nucleótido del clon SFB147

ID DE SECUENCIA NO:	DESCRIPCIÓN
43	Secuencia de nucleótido del clon SFB62 I
44	Secuencia de nucleótido del clon SFB3
45	Secuencia de nucleótido del clon FDA89
46	Secuencia de nucleótido del clon FDA39
47	Secuencia de nucleótido del clon SFB34
48	Secuencia de nucleótido del clon FDA58
49	Secuencia de nucleótido del clon SFB148
50	Secuencia de nucleótido del clon MET18
51	Secuencia de nucleótido del clon MET123
52	Secuencia de nucleótido del clon SFB59
53	Secuencia de nucleótido del clon G241
54	Secuencia de nucleótido del clon SFB7
55	Secuencia de nucleótido del clon FDA71
56	Secuencia de nucleótido del clon RD56
57	Secuencia de nucleótido del clon SFB99 II
58	Secuencia de nucleótido del clon SFB70
59	Secuencia de nucleótido del clon SFB130 I
60	Secuencia de nucleótido del clon SFB39
61	Secuencia de nucleótido del clon SFB21
62	Secuencia de nucleótido del clon MT30
63	Secuencia de nucleótido del clon SFB78
64	Secuencia de nucleótido del clon RD48
65	Secuencia dejadora delantera y reversa del clon P4T8

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** es una representación fotográfica de autoradiogramas que muestran los loci de segregación mediante los marcadores RFLP KT19 (A), FDA39 (B). UP 1026 y T128 son del parental femenino, *oleífera* Colombiana y el parental masculino, *Nigerian guineensis*, respectivamente. (←) indica bandas de segregación.

La **Figura 2** es una representación esquemática de un mapa de AFP, RFLP y SSR combinado de híbrido interespecífico (Palma T128).

La **Figura 3** es una representación gráfica de las gráficas de QTL para IV y composición de ácido graso (C14:0, C16:0, C16:1, C18:0).

La **Figura 4** es una representación fotográfica de la validación de la sonda CB75A en palmas independientes.

La **Figura 5** es una representación gráfica de las gráficas de QTL para la composición de ácido graso (C14:0, y C16:1) en la segunda población de mapeo. Los mismos marcadores RD56 y P4T8, parecen estar ligados al contenido de C14:0 y C16:1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE ALGUNAS REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

La presente invención provee métodos para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de dicha planta. La invención se relaciona particularmente con el uso de marcadores moleculares, particularmente marcadores genéticos para la identificación del contenido de ácido graso, especialmente el contenido de ácido graso saturado e insaturado

en el aceite aislado de dicha planta. Dichos ácidos grasos saturados incluyen ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), y ácido esteárico (C18:0). Los ácidos grasos insaturados incluyen ácido palmitoléico (C16:1), ácido oléico (C18:1), ácido linoléico (C18:2) y ácido alfa-linoleico (C18:3).

Al describir o reivindicar la presente invención, se usa la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones indicadas a continuación.

Antes de describir la presente invención en detalle, se entenderá que a menos que se indique de otra, la invención sujeto no está limitada a formulaciones o componentes específicos, métodos de fabricación, regímenes de dosificación o similares porque estos pueden variar. También se entenderá que la terminología usada aquí es para el propósito de describir realizaciones particulares solamente y no pretende ser limitante.

Se debe notar que, como se usa en la descripción sujeto, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen aspectos plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a un "compuesto" incluye un solo compuesto, así como dos o más compuestos; referencias a "un agente activo" incluyen un solo agente activo, así como dos o más agentes activos; "una holociclotoxina" incluye una sola holociclotoxina o dos o más holociclotoxinas y así sucesivamente.

El término "palma de aceite", como se usa aquí, debe entenderse como que se refiere a plantas de palma de aceite que incluyen especies tales como *Elaeis oleifera* y *Elaeis guineensis*, incluyendo variedades modificadas o variantes genéticas de las mismas.

El término "fruto" como se usa aquí pretende abarcar cualquier objeto que es producido por una planta en respuesta a un evento de fertilización, ya sea auto

fertilización o no auto fertilización, y si el fruto resultante es o no estéril. Por ejemplo, tanto una manzana como las semillas de la manzana deben ser aquí vistas como "fruto". Como otro ejemplo, los frutos sin semillas, tales como uvas o mandarinas, son frutos. "Fruto" no se limita a objetos comestibles. Por ejemplo, las bayas venenosas del tejo son "frutos" porque son cualquier fruto y nuez producida por las palmas. Otro "fruto" ejemplar incluye cacahuete, tomates, maíz, bananas, granos de trigo, peras, etc.

El término "aceite" usado aquí intercambiamente para referirse a cualquier material o mezcla de materiales que está compuesto principalmente de una o más sustancias altamente hidrofóbicas tales como ácidos grasos o grasas verdaderas (p.e., ésteres de ácidos grasos y glicerol).

El término "marcador molecular" incluye cualquier fragmento de gen que se puede usar para seleccionar para un fenotipo, o el cual cuando se expresa, facilita la identificación y/o selección de células que son transfectadas o transformadas con un constructo genético de la invención o un derivado del mismo.

Los términos tales como "hibridación", "hibridizar" y similares se usan aquí para denotar el emparejamiento de secuencias de nucleótido complementarias para producir un híbrido de ADN-ADN o un híbrido de ADN-ARN. Las secuencias base complementarias son aquellas secuencias que se relacionan mediante reglas de emparejamiento de base. En el ADN, A se empareja con T y C se empareja con G. En el ARN, U se empareja con A y C se empareja con G. En este aspecto, los términos "coincide" y "no coincide" como se usan aquí, se refieren al potencial de hibridación de los nucleótidos emparejados en las cadenas de ácido nucleico complementario. Los nucleótidos coincidentes se hibridizan eficientemente, tal como el par base A-T y G-C clásico mencionado

anteriormente. Las disparidades no coincidencias son otras combinaciones de nucleóticos que no se hibridizan eficientemente.

En una realización preferida de la presente invención, se analizó una población de mapeo interespecífica derivada del cruce del parental femenino Colombiano, UP 1026 (*Elaeis oleifera*) x el parental masculino Nigeriano, T128 (*Elaeis guineensis*). Con el fin de determinar los marcadores asociados con el valor de yodo (IV), se desarrollaron marcadores de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (designados CB75A y RD56) que son capaces de diferenciar palmas que tienen un aceite insaturado alto o bajo (medido en términos de valor de yodo, IV). Estos marcadores de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), CB75A y RD56 son capaces de diferenciar palmas que tienen aceite insaturado alto y bajo (medido en términos de valor de yodo, IV) así como palmas que tienen cantidades altas y bajas de ácidos grasos, a saber ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1), ácido esteárico (C18:0) y ácido oléico (C18:1). Las sondas de RFLP usadas para seleccionar la familia de mapeo interespecífico fueron clones de ADNc obtenidas de varias librerías de ADNc (plantas de semillero etioladas jóvenes, mesocarpio, nuez y raíz) en donde el marcador, CB75A, es una sonda de ADN complementario (ADNc) obtenida de una librería de callo, mientras que el marcador RD56, es una sonda de ADNc obtenida de una librería radicular. Para el procedimiento de selección, se llevaron a cabo transferencia de Southern, pre-hibridación e hibridación. Alternativamente, la presente invención también involucra la aplicación de marcadores de polimorfismo de la longitud del fragmento amplificado (AFLP) y microsatélite (SSR) para análisis adicionales sobre el contenido de ácido graso (FAC) de la planta de palma de aceite. Se construyó un mapa a partir de los análisis de AFLP, RFLP y SSR de la progenie derivada del cruce interespecífico mencionado anteriormente que involucra el parental femenino Colombiano, UP1026 (*Elaeis oleifera*) y el parental masculino Nigeriano, T128 (*Elaeis*

guinneensis) en donde dicho cruce interespecífico se usó para mapear genes asociados con la calidad del aceite. Se generó un mapa de marco para el parental masculino Nigeriano, T128 (*Elaeis guinneensis*), usando *Joinmap* ver. 3.0. En el mapa de *guinneensis* parental, 389 marcadores (305 AFLP, 64 RFLP y 20 SSR) fueron ordenados en 18 grupos de ligamiento (1571cM). El mapa de *E. guinneensis* también se usó para escanear los loci (puntos) de rasgos cuantitativos (QTLs) que controlan la calidad del aceite que es medida en términos de valor de yodo, IV y la composición de ácido graso, FAC. RFLP, AFLP y SSR se usaron para estudiar la selección del marcador, los análisis de segregación de los marcadores AFLP, RFLP y SSR en la población de mapeo, el análisis de ligamiento, segregación de marcadores asociados con los loci de rasgos cuantitativos (QTLs) y validación de sondas en palmas independientes y segunda población de mapeo.

Los marcadores no estaban cubiertos en el experimento de mapeo genético usando el cruce interespecífico anterior que involucra la especie Colombiana *Elaeis oleifera* (UP 1026) y la especie Nigeriana *Elaeis guinneensis* (T128). El mapa de *E. guinneensis* se usó en el barrido para los loci de rasgos cuantitativos (QTLs) que controlan la calidad de aceite (medidos en términos de valor de yodo y composición de ácido graso) porque los rasgos cuantitativos asociados con la calidad del aceite eran de interés de este estudio. A un nivel de umbral de ancho genómico significativo 99%, se detectaron los QTLs asociados con el valor de yodo (IV), C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1. Los QTLs también explican una proporción significativa (aproximadamente 35%) de la variación observada. Los marcadores asociados con IV y FAC (C14:0, C16:0, C16:1 y C18:1) fueron confirmados en una segunda población de mapeo o en palmas de genotipo diferente. Los marcadores afectados son sondas RFLP, a saber CB75A (para IV, C16:0, C18:1) y RD56 (para C14:0) y el marcador microsatélite (SSR) P4T8 (para C18:0 y C16:1). Se ha postulado que la identificación de estos marcadores asociada con IV y FAC, hará más fácil a

los cultivadores seleccionar palmas deseables para plantar en la etapa de vivero y/o seleccionar las palmas apropiadas para cruce posterior para ayudar a alterar los niveles de saturación del aceite de palma o la composición de ácido graso. Los marcadores pueden ser aplicados inmediatamente a la selección para genotipos con diferentes niveles de insaturación, así como composición de ácido graso, en donde con la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto y la ausencia de dicho marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC insaturado alto.

Algunos aspectos importantes de la presente invención se han descrito en la sección anterior titulada "RESUMEN DE LA INVENCION".

Aspectos o realizaciones adicionales de la presente invención se describirán ahora en los siguientes párrafos. Aspectos adicionales de la invención proveen un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de dicha planta, dicho método comprende detectar la presencia o ausencia de un marcador genético en la planta, dicho marcador genético corresponde a una secuencia de nucleótido que tiene al menos 90% de identidad para al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:3, o una secuencia complementaria a esta, en donde la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto, y la ausencia de dicho marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC insaturado alto, o en donde el marcador genético es CB75A y/o en donde el ácido graso saturado es seleccionado del grupo que consiste de: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0). En los aspectos adicionales o realizaciones de la invención mencionadas anteriormente, el nivel de FAC saturado puede ser mayor que cada uno de los siguientes porcentajes de FAC total, a saber mayor que 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% del FAC total.

Ya aspectos o realizaciones adicionales de la presente invención proveen un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de dicha planta, dicho método comprende detectar la presencia o ausencia de un marcador genético en la planta, dicho marcador genético corresponde a una secuencia de nucleótido que tiene al menos 90% de identidad para al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:3, o una secuencia complementaria a esta, en donde la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto y la ausencia de dicho marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC insaturado alto o en donde el marcador genético es CB75A y/o en donde el ácido graso insaturado es seleccionado del grupo que consiste de ácido oléico (C18:1), ácido linoléico (C18:2) y ácido alfa-linoléico (C18:3). En los aspectos o realizaciones adicionales de la invención anteriores, el nivel de FAC insaturado puede ser mayor que cada uno de los siguientes porcentajes de FAC total, a saber mayor de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de FAC total. En los aspectos/realizaciones adicionales de la invención mencionados, el nivel de ácido oléico puede ser 60%. Cuando el nivel de ácido oléico es 60%, el nivel de ácido palmítico puede ser 25%.

Aspectos adicionales de la invención proveen un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de dicha planta, dicho método comprende detectar la presencia o ausencia de un marcador genético en la planta, dicho marcador genético corresponde a una secuencia de nucleótido que tiene al menos 90% de identidad para al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:3, o una secuencia complementaria a esta, en donde la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto y la ausencia de dicho marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC insaturado alto o en donde el marcador genético es CB75A y/o en donde la ausencia del marcador

genético es indicativa además de una planta que tiene un alto valor de yodo (IV). En los aspectos de la invención adicionales anteriores, el valor de yodo (IV) puede ser mayor de cada uno de los siguientes valores IV, a saber mayor de 60, 70, 80, 90, 95 o 98.

En ya aspectos adicionales de la invención, se provee un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de dicha planta, dicho método comprende detectar la presencia o ausencia de un marcador genético en la planta, dicho marcador genético corresponde a una secuencia de nucleótido que tiene al menos 90% de identidad para 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:56, o una secuencia complementaria a esta, en donde la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto y la ausencia de dicho marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC insaturado alto o en donde el marcador genético es RD56 y/o en donde el ácido graso saturado (FAC saturado) es ácido mirístico. En los aspectos adicionales anteriores de la invención, el nivel de FAC saturado puede ser mayor que cada uno de los siguientes porcentajes de FAC total, a saber mayor de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de FAC total. En los aspectos anteriores de la invención, el FAC insaturado puede ser ácido palmitoléico (C16:1). En los aspectos adicionales anteriores de la invención, el FAC insaturado puede ser mayor que cada uno de los siguientes porcentajes de FAC total, a saber mayor de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% de FAC total.

Aspectos adicionales de la invención también proveen un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de dicha planta, dicho método comprende detectar la presencia o ausencia de un marcador genético en la planta, dicho marcador genético corresponde a una secuencia de nucleótido que tiene al menos 90% de

identidad para al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:65, que es la secuencia cebadora para el conjunto cebador de microsatélite P4T8, como se muestra en el Adjunto 1, o una secuencia complementaria a esta, en donde la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto y la ausencia de dicho marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC insaturado alto, o en donde el marcador genético es P4T8 y/o en donde el ácido graso saturado (FAC saturado) es ácido esteárico. En los aspectos adicionales mencionados anteriormente de la invención, el nivel de FAC saturado puede ser mayor que cada uno de los siguientes porcentajes de FAC total, a saber mayor de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de FAC total. En los aspectos mencionados anteriormente de la invención, el FAC insaturado puede ser ácido palmitoléico (C16:1). En los aspectos adicionales de la invención mencionados anteriormente, el FAC insaturado puede ser mayor que cada uno de los siguientes porcentajes de FAC total, a saber mayor de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% de FAC total.

En todos los aspectos/realizaciones de la invención descrita en las gráficas anteriores de esta sección así como la sección titulada "RESUMEN DE LA INVENCION", la planta puede ser una planta de palma de aceite.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Materiales de Planta

Se analizó una población de mapeo interespecífica derivada del cruce UP1026 (*E. Oleifera*) x T128 (*E. guineensis*). El parental femenino, UP1026, es una

oleifera Colombiana y el parental masculino, T128, es una *guineensis* Nigeriana que produce aceite con un valor de yodo (IV) alto. Se usó polinización controlada para generar la población de mapeo.

Se plantaron y evaluaron un total de 117 palmas en una ubicación en United Plantations, Teluk Intan, Perak, Malasia. Se recolectaron muestras de hojas no abiertas (punta de lanza) de todas las 117 palmas individuales y se congelaron inmediatamente bajo nitrógeno líquido y luego se almacenaron a - 80°C hasta la preparación del ADN.

Con el fin de determinar los marcadores asociados con el valor de yodo (IV), ácido palmítico (C16:0) y ácido oléico (C18:1), las muestras de hojas fueron cosechadas de 13 palmas de un cruce interespecífico diferente. La composición de ácido graso (FAC) para cada una de las palmas había sido determinada previamente.

También se usó una segunda población para verificar los marcadores asociados con el contenido de ácido mirístico (C14:0) y contenido de ácido palmitoléico (C16:1). La población de mapeo usada fue auto derivada de palma *tenera* con alto valor de yodo (IV), T128, de la colección de plasma germinal Nigeriano MPOB (Rajanaidu, Major developments in oil palm (*Elaeis guineensis*) breeding, Proceedings of the 12th Plenary Meeting of Association for the Taxonomic Study of the Flora of Tropical Africa (AETFAT), pp 39-52, Mitteilungen Inst. Allg. Bot. Hamburg, Alemania, 1990; Cheah and Rajinder, Project Completion Report No. 0057/98, 16th July 1999, Malaysian Palm Oil Board (MPOB), 1999). Se usó auto-polinización para generar la familia de mapeo. Se plantaron un total de 320 palmas en varias locaciones en Malasia, incluyendo la Estación de Investigación MPOB-UKM en Bangi, Selangor, la Estación de Investigación Ulu Paka en Terengganu, la Estación de Investigación Keratong en Kluang, Johore, la Estación de Investigación Lahad

Datu en Sabah y United Plantations, Teluk Intan, Perak. En este estudio se usaron un total de 192 palmas de MPOB-UKM, Ulu Paka y United Plantations para el propósito del mapeo de ligamiento genético.

Preparación del ADN genómico

El ADN fue preparado de hojas en lanza jóvenes con base en el método Doyle y Doyle, *FOCUS* 12:13-15 (1990).

Procedimiento de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

El análisis de AFLP se llevó a cabo usando los pares de enzimas *EcoRI/MseI* y *TagI/HindIII*. El ensayo *EcoRI/MseI* se realizó usando el Sistema de Análisis 1 de GIBCO BRL AFLP (INVITROGEN, USA), esencialmente como se describe en el manual del fabricante. El análisis de AFLP usando los pares de enzimas *TagI/HindIII* se realizó esencialmente como lo describe Rafalski *et al*, *Non-mammalian Genomic Analysis-A Practical Guide*, ed. B. Birren, y E. Lai, San Diego, Academic Press (1996).

Ejemplo 2

Análisis de polimorfismo de la longitud de fragmento de restricción (RFLP)

i. Sondas de RFLP

Las sondas de RFLP usadas para detectar la familia de mapeo de híbrido interespecífico fueron clones de ADNc obtenidos de varias librerías de ADNc (plantas de semillero etioladas jóvenes, mesocarpio, nuez y raíz) construídas previamente como se describe en Cheah, Informe de Terminación del Proyecto

No. 0011/95, Mayo 4 de 1996, Malaysian Palm Oil Board (MPOB) (1996). También se usaron clones de ADNc de una librería de flor sustraída (Cheah y Rajinder, Informe de Terminación del Proyecto No. 0057/98, Julio 16 de 1999, Malaysian Palm Oil Board (MPOB), 1999) para detectar la población de mapeo. Las secuencias para estos clones se revelan en las SEQ ID NOs: 1 a 64.

El ADN plásmido se preparó a partir de clones individuales usando purificación de columna (Qiagen, USA). Se examinó la presencia del inserto de ADN mediante digestión de restricción (*EcoRI*) y electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Se seleccionaron clones de ADNc con inserciones de tamaños mayores a 500 pares base (bp – por sus siglas en inglés) para seleccionar su capacidad de detectar RFLP en la población de mapeo.

Las sondas de ADN se diluyeron hasta una concentración de 5 ng/μl en amortiguador TE. La sonda de ADN fue entonces marcada con $\alpha^2\text{P}$ -dCTP (patrón de 3000 Ci/mmol) usando el sistema de marcado de ADN Megaprime (GE Healthcare), como lo recomendó el fabricante. La sonda marcada fue separada de los nucleótidos no incorporados mediante purificación a través de una columna Sephadex como se describe en Sambrook *et al*, A Laboratory manual, (2ª edición). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

ii. Transferencia de Southern e hibridación

Para el procedimiento de detección, muestras de ADN (20 μg) de 10 palmas (incluyendo las palmas parentales) se digirieron con 14 enzimas de restricción (*Bam*HI, *Bcl*I, *Bgl*II, *Dra*I, *Eco*RI, *Hinc*II, *Hind*III, *Scal*, *Sst*I, *Xba*I, *Bst*NI, *Hae*III, *Rsa*I y *Taq*T). Los fragmentos de ADN restringidos fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en 1 x amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M, pH 7.9, EDTA 1 mM) y luego se transfirieron sobre membranas de

nylon (Hybond N+, GE Healthcare Biosciences, UK) mediante transferencia al vacío.

El conjunto de 140 muestras fue entonces hibridado a su vez con cada sonda candidata para identificar la combinación sonda/enzima de restricción que produjo un perfil de segregación. En el caso de más de una enzima que muestra polimorfismo con una sonda particular, se seleccionó la combinación de sonda/enzima que produjo un perfil claro de copia única/baja para detectar la población de mapeo entera, escindida con la enzima de restricción apropiada.

La pre-hibridación y la hibridación se realizaron en tubos de vidrio en un horno rotisserie a 65 °C. Las membranas fueron pre-hibridadas por cerca de 6 horas en una solución que contiene amortiguador de pre-hibridación que consiste de: 5 x solución SSPE (NaCl 3M, fosfato de sodio 0.2 M, EDTA 20 mM pH 8.0), SDS al 0.5%, 5 x solución de Denhardt (Ficoll al 0.1%, polivinilpirolidona al 0.1%, Fracción V de Albúmina Bovina al 0.1 %) y 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque desnaturalizado. El amortiguador de pre-hibridación fue removido y reemplazado con solución de hibridación de 5 x SSPE (NaCl 3 M, fosfato de sodio 0.2 M, EDTA 20 mM pH 8.0), SDS al 0.5% y 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque desnaturalizado. Las sondas marcadas fueron desnaturalizadas mediante calentamiento en baño de agua en ebullición por 10 min y hundiéndolo en agua con hielo, antes de la adición al amortiguador de hibridación. La sonda se agregó hasta una concentración de aproximadamente $1-3 \times 10^6$ cpm/ml. La hibridación se realizó durante la noche a 65 °C.

Las membranas hibridadas fueron lavadas dos veces en 2 x SSC (NaCl 0.3 M, citrato trisódico 30 mM, pH 7), SDS al 0.1% a 65 °C por 15 min cada vez, seguidas por una vez en 1 x SSC (NaCl 0.15 M, citrato trisódico 15 mM pH 7), SDS al 0.1% a 65°C por 15 min. Las membranas fueron entonces

autoinjertadas a -80 °C usando películas de rayos X con pantallas de intensificación por 7 a 10 días, las películas de rayos X se desarrollaron usando 0.22 x desarrollador GBX Kodak por 5 min, se enjuagaron con agua destilada, seguida por un lavado final con 0.2 x fijador GBX Kodak por 5 min.

EJEMPLO 3
Microsatélites

A. Aislamiento de Microsatélites en Palma de Aceite

Se usaron cebadores degenerados descritos por Fisher *et al*, *Nucleic Acids Research* 24:4369- 4371 (1996) y Brachet *et al*, *Molecular Ecology* 8:160-163 (1999) para aislar clones que contienen secuencias de microsatélite en la palma de aceite. Se realizó PCR separadamente para las dos muestras de ADN parental, T128 (*Nigerian guineensis*) y UP 1026 (*oleifera* Colombiana) usando el protocolo descrito por Fisher *et al*, *Nucleic Acids Research* 24:4369-4371 (1996). La mezcla post PCR fue clonada usando el kit de clonación TOPO-TA (INVITROGEN, USA), esencialmente como lo recomienda el fabricante. Se realizó el secuenciamiento en ambas cadenas usando cebadores delanteros y reversos M13 (INVITROGEN, USA) usando un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems). Se diseñaron cebadores específicos en las regiones de flanco de los microsatélites usando el software PRIMER 3 (Rozen y Skaletsky, *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, pp: 365- 386, 2000).

Un cebador para cada par de cebador fue marcado en el extremo 5' a 37 °C por 30 min usando T4 polinucleótido quinasa (INVITROGEN, USA). Las reacciones de marcado contenían 50 pmoles de cebador, 3 µl de γ -³³P dATP (Amersham 3000 Ci/mmol), 1 U de T4 polinucleótido quinasa en un volumen total de 25 µl. Posteriormente, se realizó la reacción de PCR esencialmente como lo describe

Billotte *et al*, *Genome* 44:413-425 (2001). Después que la PCR estaba completa, las reacciones fueron detenidas mediante la adición de 25 µl de amortiguador de formamida (azul de bromofenol al 0.3%, xileno cianol al 0.3%; EDTA 10 mM pH 8.0; formamida desionizada al 97.5%). Cada reacción de PCR fue sometida a electroforesis en un gel de acrilamida desnaturalizada al 6% que contiene urea 7M usando 0.5 x amortiguador de TBE a potencia constante de 40 W por 3 horas. Los geles fueron entonces secados y expuestos a película de rayos X (Kodak) por 3-4 días a -80 °C. Se hizo el dimensionamiento de cada alelo usando la escala de peso molecular de AFLP (INVITROGEN, USA).

También se evaluaron los cinco EST-SSRs descritos por Chua *et al*, *Scientific Meeting*, pp 127, Melaka, Malaysia 19th -21st July 2004 (2004) y desarrollados por el laboratorio en MPOB sobre la población de mapeo.

B. Aplicación de las Secuencias de Microsatélite de la Palma de Aceite Publicadas

Los 18 pares de cebadores de microsatélite publicados (Billotte *et al*, *Genome* 44:413-425, 2001) también fueron evaluados en la población de mapeo. Todos los pares cebadores fueron sintetizados con base en las secuencias publicadas y evaluados en un pequeño número de población de mapeo como se describió anteriormente. Los pares de cebadores informativos fueron entonces usados para detectar la población de mapeo completa.

Análisis de datos

Los resultados moleculares fueron analizados de acuerdo con un modelo de pseudo cruzamiento de prueba doble descrito por Grattapaglia y Sederoff, *Genetics* 137:1121-1137 (1994). Los datos de los RFLP, AFLP y SSR fueron

calificados y codificados de acuerdo con Lespinasse *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 100:127-138 (2000) y Billotte *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 110:754-765 (2005). Las bandas de segregación fueron evaluadas usando las pruebas de chi-cuadrado para bondad de ajuste a las relaciones de segregación esperadas ($P=0.05$). Los perfiles de segregación observados y calificados se resumen en la Tabla 1.

Construcción del Mapa

La construcción del mapa se realizó usando el programa de computadora JoinMap versión 3.0 (Ooijen y Voorrips, JoinMap 3.0: Software para cálculo de los mapas de ligamiento genético. Wageningen, 2001). El cruzamiento interespecífico fue analizado como una población resultante de un cruce entre dos padres diploides heterocigotos. Se usó el Polinizador Cruzado (CP) de código de tipo de población en el análisis. El conjunto de datos del parental femenino y el parental masculino se analizaron por separado.

Los marcadores fueron primero divididos en grupos de ligamiento usando un umbral de calificación LOD de 5.0. El puntaje LOD calculado en JoinMap versión 3.0 se basa en la prueba de chi-cuadrado para independencia de segregación. Después de ser divididos en grupos de ligamiento, se aplicaron los parámetros de severidad para la construcción del mapa que es un valor de recombinación de 0.32 y un puntaje LOD de 1.0. Se realizó un rizado después de la adición de cada tres marcadores y se calcularon las distancias del mapa usando la función de mapa de Kosambi. El ordenamiento producido en el segundo ciclo se usó para la construcción del mapa.

En unos pocos casos, se descartó un marcador durante la etapa de mapeo si su presencia causaba inconsistencias en el mapa. Tales marcadores fueron identificados mediante inspección del valor chi-cuadrado después de cada

extensión del mapa. Un salto en el valor de bondad de ajuste indica que el marcador recién agregado al mapa causa “fricción interna” (Stam, *The Plant Journal* 3: 739-744, 1993).

Análisis de datos Cuantitativo

Los rasgos cuantitativos asociados con la calidad del aceite eran de interés en este estudio. Los criterios usados racimos maduros fueron como se describe en Corley y Tinker, *The Oil Palm* (4ª edición), pp: 287-326, Blackwell Science (2003), una fruta suelta por racimo (sin importar la altura de la palma).

Los racimos después de cosechados fueron marcados cuidadosamente y devueltos al laboratorio. El aceite fue recolectado del mesocarpio del racimo como lo describe Rao *et al*, *PORIM Occasional Paper* 9: 1-28 (1983). Las muestras de aceite fueron almacenadas en viales oscuros a -20 °C antes de ser enviadas a laboratorio analítico de MPOB para el siguiente análisis:

- i) Valor de Yodo (IV)
- ii) Composición de ácido graso (FAC), a saber:
 - C14:0: ácido mirístico
 - C16:0: ácido palmítico
 - C16:1: ácido palmitoléico
 - C18:0: ácido esteárico
 - C18:1: ácido oléico
 - C18:2: ácido linooléico

El muestreo se realizó en todas las 117 palmas en la población de mapeo. En total, 81 palmas fueron muestreadas exitosamente, el aceite extraído de sus racimos y se realizó en análisis apropiado. Los datos fueron obtenidos durante un período de 2 años

El análisis de mapeo de QTL se realizó usando mapeo de intervalo implementado en MapQTL versión 4.0 (Ooijen, MapQTL 4.0: Software para el cálculo de la posición de QTLs en el mapa genético. Wageningen, 2002). Los umbrales empíricos para la detección de QTL se calcularon usando la prueba de permutación, también implementada mediante MapQTL versión 4.0 (Ooijen, MapQTL 4.0: Software para el cálculo de la posición de los QTLs en el mapa genético. Wageningen, 2002).

Ejemplo 4

Detección del Marcador

Se calificaron un total de 3,993 loci de AFLP en la progenie usando los 67 pares de cebador AFLP (Tabla 2). El número de fragmentos detectables obtenidos para cada combinación varió de 25 a 125, con tamaños de bandas que varían de 50 a 500bp. Generalmente, se obtuvieron un número menor de bandas con cebadores que tenían dinucleótidos CG. Los cebadores con contenido AT usualmente produjeron mayores números de bandas (datos no mostrados). Esto también confirma la baja frecuencia de los dinucleótidos CG en híbridos interespecíficos de palma de aceite, similar a la reportada para otros genomas de plantas (Moore *et al*, *Bio/Technology* 11:584-589, 1993). De las 3993 bandas de AFLP observadas, 418 (10.5%) eran polimórficas y de segregación en la progenie (Tabla 2). Generalmente, la mayoría de los marcadores de segregación calificados, 410 (98%) estaban en la configuración de pseudo-cruzamiento de prueba en donde cualquiera, el parental masculino era heterocigoto y el fragmento estaba ausente en el parental femenino (perfil tipo b) o vice versa (perfil tipo a) (Tabla 1).

Un total de 287 sondas de ADNc de varias librerías de ADNc fueron evaluadas para su capacidad de detectar la segregación en la progenie usando el criterio

de RFLP. De los 287 clones seleccionados, 69 (24%), mostraron polimorfismos con al menos una enzima de restricción, 167 (58%) eran monomórficas y 51 (18%) no produjeron patrón de banda claro. La Figura 1 muestra el perfil de banda producido por sondas de copia baja que se segregan en la población de mapeo. El porcentaje de sondas polimórficas identificadas (24%) fue similar a la tasa de 25% de sondas RFLP polimórficas (de la librería genómica) reportada por Mayes et al., *Genome* 40:116-122 (1997) para la palma de aceite anteriormente. De las 69 sondas de RFLP que muestran polimorfismos, 64 (93%) fueron heredadas del parental masculino *E. guineensis* (Tabla 2). Esto parecía indicar que las sondas de RFLP usadas en este estudio barrieron principalmente las regiones homocigóticas de la palma parental *E. oleifera* que no eran de segregación en la progenie de mapeo, reduciendo así el número de sondas polimórficas reveladas. Cuatro de estas 69 sondas, revelaron dos loci polimórficos, dando un total de 73 loci polimórficos.

Entre los 33 pares cebadores de SSR desarrollados en el curso de este estudio, nueve eran informativos y de segregación en la población de mapeo. Los loci de SSR desarrollados por Billotte et al, *Genome* 44:413-425 (2001) también fueron evaluados en la población de mapeo. De los 18 pares cebadores evaluados, siete se segregaron en la población de mapeo. Seis se segregaron en los gametos parentales masculinos *E. guineensis* solamente, mientras que uno se segregó en los gametos femeninos *E. oleifera* solamente. Tres de cinco EST-SSRs evaluados, (CNH0887, CNH1537 y EAP3339) mostraron polimorfismo en la población de mapeo. Todos los tres pares cebadores informativos se segregaron solamente en los gametos del parental masculino, *E. guineensis*. La información sobre los pares cebadores de SSR informativos se provee en la Tabla 3 y el Adjunto 2. Tres de los cebadores SSR informativos revelaron dos loci cada uno.

Ejemplo 5

Análisis de segregación de marcadores AFLP, RFLP y SSR en la población de mapeo

Se encontró que la mayoría de las bandas de segregación se segregan en los gametos del parental masculino (palma T128, *E. guineensis*). De los 513 marcadores (418 AFLP, 73 RFLP y 22 SSR) identificados que se segregaron en la población de mapeo, 454 (365 AFLP, 68 RFLP y 21 SSR) se segregaron en los gametos del parental masculino, *E. guineensis* Nigeriano y 51 (9.9%) se segregaron en los gametos del parental femenino, la oleífera Colombiana (Tabla 2). Esto indica que el parental masculino es más heterocigoto que el parental femenino, *E. oleífera*. Una alta proporción de marcadores polimórficos en el parental femenino no se segregaron, la mayoría probablemente porque eran homocigotos en estos loci. Como tal, solamente se podrían generar suficientes marcadores bajo el procedimiento experimental presente para permitir el desarrollo de un mapa de ligamiento genético para el parental masculino. Por lo tanto, se concluye que sería más apropiado analizar este cruzamiento como un "pseudo-cruzamiento de prueba en una vía" en el cual se considere que el masculino, *E. guineensis* es el parental heterocigoto y el parental *E. oleífera* Colombiana, el parental homocigoto. El bajo nivel de heterocigocidad detectado en la oleífera Colombiana podría explicarse por el hecho que la *E. oleífera* se encuentra en áreas dispersas en el país Sur Americano (Rajanaidu, *Elaeis oleífera* collection in Central and South America. *Proceedings of International Workshop on Oil Palm Germplasm and Utilisation*, 26-27 March 1985, Selangor, Malaysia, 1985). Esto podría haber estimulado la endogamia, produciendo un genoma homocigoto relativamente alto.

Aunque algunos de los marcadores RFLP mostraron la presencia de loci duplicados, indicando una ascendencia poliploide, casi todos los marcadores evaluados mostraron herencia disómica clara. La mayoría de los marcadores

mostraron una relación de segregación de 1:1 (tip a, b, d & e), en donde la banda estaba presente solamente en un parental, o relación de segregación 3:1 (tipo c), donde la banda estaba presente en ambos parentales, que es lo esperado en caso de disomía (Lepinasse *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 100:127-138, 2000). El número limitado de marcadores que mostraron perfiles tipo "f " & "g" también mostraron perfiles de herencia de disomía claros, en los cuales los parentales y la progenie resultante tenían un máximo de dos alelos, que nunca estaban ausentes al mismo tiempo.

Ejemplo 6

Análisis de Ligamiento

Se usó un total de 365 marcadores AFLP, 68 RFLP y 21 SSR (que totalizan 454 marcadores) para generar el mapa de ligamiento para el parental T128 masculino. Se usaron solamente marcadores que segregan en la configuración de pseudo cruzamiento de prueba (perfiles tipo b, e, f & g, Tabla 1) para el análisis de ligamiento. Los marcadores que muestran el perfil "Tipo c" con una relación de segregación 3:1 (Tabla 1), no se emplearon porque las frecuencias de segregación obtenidas con dichos marcadores son típicamente imprecisas (Maliepaard *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 97: 60-73, 1998). Generalmente 447 de los marcadores analizados podrían estar ligados a al menos un marcador diferente, indicando un buen cubrimiento de genoma. Siete de los marcadores (cuatro AFLP, dos RFLP y un SSR) permanecieron no ligados en LOD 5.0. Estos marcadores no ligados podrían ser partes de muestreo del genoma donde hay otros pocos marcadores, en cuyo caso serían muy valiosos en el futuro (Marques *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 96:727-737, 1998).

Una representación gráfica del mapa de ligamiento genético obtenido se muestra en la Figura 2. En total, 389 marcadores (305 AFLP, 64 RFLP y 20

SSR) mapeados en 18 grupos de ligamiento. El número medio de marcadores por grupo de ligamiento fue de 21. La distancia genética total cubierta por los marcadores fue de 1571 cM, con un intervalo promedio de 4.1 cM entre marcadores adyacentes. La distancia de mapa de la tenera, la palma parental T128 fue similar a la distancia del mapa de tenera de 1,597 cM reportada por Billotte *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 110:754-765 (2005). Excluyendo los dos grupos más pequeños (17 y 18) que tienen solamente dos marcadores cada uno, la longitud de los grupos de ligamiento individuales varió de 28 cM a 177 cM, con un promedio de 96 cM. La longitud promedio de los grupos de ligamiento es cercana al tamaño esperado de 100-150 cM encontrado en la mayoría de las cosechas agrícolas (Maliepaard *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 97: 60-73, 1998).

Se obtuvo un exceso de grupos de ligamiento con relación al número de cromosomas haploides a pesar del número de marcadores usados relativamente alto. La falla en obtener el número de cromosoma básico, a pesar del alto número de marcadores aplicado, ha sido reportada para otras especies también (Grattapaglia y Sederoff, *Genetics* 137:1121-1137, 1994; Simone *et al*, *Molecular Breeding* 3:415-425, 1997). La razón para esto podría deberse a el tamaño de la muestra relativamente pequeño de la progenie F₁ usada en este estudio. Otra explicación posible podría ser la falta de marcadores polimórficos en regiones cromosómicas particulares, que podría deberse al sistema de marcadores que es empleado y/o la presencia de regiones homocigotas grandes en el genoma de la planta parental femenina *E. oleífera* usada para crear la población híbrida interespecífica usada en este estudio.

Se encontró que los marcadores están bien distribuidos en los 18 grupos de ligamiento. No hay espacios mayores a 20 cM, siendo el espacio más grande 20 cM en el Grupo 3 y 18 cM en el Grupo 1. Esto indica que el mapa ofrece una homogeneidad relativa de la distribución del marcador y será útil para etiquetar

rasgos de interés económico para el propósito de selección asistida por marcador. También esperamos que los espacios existentes desaparezcan con la adición de más marcadores al mapa.

El armazón de este mapa de ligamiento está compuesto de AFLPs que parecen cubrir el genoma uniformemente. Sin embargo, hubo regiones del mapa con (p.e., Grupos 1 y 3), donde se observó algún agrupamiento de marcadores AFLP alrededor del mismo locus. El agrupamiento de marcadores es observado comúnmente para muchas especies de cosechas y puede tener una base biológica porque corresponden a regiones de frecuencias de recombinación reducidas tales como centrómeros y/o regiones teloméricas (Tanksley *et al*, *Genetics* 132: 1141-1160, 1992; Keim *et al*, *Crop Science* 37:537-543, 1997). El agrupamiento limitado de los marcadores AFLP observado en este estudio no estaba relacionado con las combinaciones de cebadores usadas para generar estos marcadores, pero es debido probablemente a la resolución limitada de la población de mapeo como lo indica Grando *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 106:1213-1224 (2003).

De los 68 loci de RFLP usados para el análisis de ligamiento, 64 (94%) fueron mapeados exitosamente.

Los marcadores de RFLP estaban generalmente bien distribuidos a lo largo de los grupos de ligamiento.

Hubo ciertos casos (p.e., Grupos 4 y 11), en donde los marcadores de RFLP están rara vez interrumpidos por loci AFLP, que de hecho tendieron a flanquear los marcadores RFLP.

Sin embargo, hubo muchas regiones donde ambos sistemas de marcadores se entremezclaron y como tales, probablemente no en esta etapa del estudio, representan distintas regiones.

Sin embargo, como los marcadores de RFLP estaban bien distribuidos a través de los grupos de ligamiento, esto es buen augurio para que sean usados como marcadores de anclaje potenciales para integración o comparación de mapas entre varias poblaciones. Los marcadores de RFLP usados se listan en la Tabla A.

Con el fin de mejorar el cubrimiento del genoma, también se intentó el mapeo de los loci de SSR. De los 21 loci de SSR que se segregan en los gametos parentales masculinos, 18 mapearon en el puntaje LOD de 5.0. Hay que reconocer que debido al bajo número de marcadores SSR empleados, solamente nueve de los 18 grupos tenía al menos un marcador SSR cada uno. Sin embargo, la presencia de los marcadores SSR en estos grupos junto con los marcadores de RFLP los hace más conveniente para la integración o comparación del mapa genético. El desarrollo del SSR adicional a partir de la colección de ESTs existente está en progreso, y se anticipa que los EST-SSRs ayudarán con la saturación del mapa en el futuro.

La proporción de marcadores con relación de segregación distorsionada en este estudio fue de aproximadamente 22% (Tabla 2). Esto fue ligeramente mayor que el reportado para la palma de aceite previamente (menos de 10%) (Billotte *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 110:754-765, 2005) y otras especies, tales como *Eucalyptus* (15%) (Marques *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 96:727-737, 1998) y albaricoque (17% para marcadores de AFLP) (Vilanova *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 107: 239-247, 2003). Sin embargo, la distorsión de segregación fue mucho menor que las observadas para rosas (27%) (Rajapakse *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 103:575-

583, 2001) y café (30%) (Ky *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 101:669-676, 2000). Sin embargo, 78% de los marcadores se segregaron en las relaciones esperadas, indicando que una mayoría de los marcadores fueron heredaron de una manera Mendeliana estable.

Los loci que muestran distorsiones desviadas estaban localizados en su mayoría en el Grupo 4, 7 y 11. En estos grupos los marcadores que muestran relaciones distorsionadas se mapearon cerca entre sí formando grupos de marcadores distorsionados. El agrupamiento de marcadores distorsionados en una región particular del grupo de ligamiento puede sugerir una base biológica, reflejando posiblemente una alta tasa de formación de heteroduplex y desemparejamiento durante la meiosis, que da lugar a distorsiones de segregación (Ky *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 101: 669-676, 2000). Se espera que ocurra la formación de Heteroduplex y desemparejamiento en la meiosis en híbridos interespecíficos debido a diferencias en el contenido de ADN entre parentales usados en el cruzamiento (Barre *et al*, *Cytometry* 24:32-38, 1996). Algunos de los fragmentos distorsionados estaban disperses en diferentes grupos de ligamiento y no se agruparon, sugiriendo que en estos grupos, razones estadísticas (población de mapeo relativamente pequeña) en lugar de una base biológica era responsable de la distorsión (Marques *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 96:727-737, 1998).

Ejemplo 7

Rasgos Cuantitativos

Se mapearon los QTLs asociados con el valor de yodo (IV) y la composición de ácido graso (FAC) en la palma de aceite. IV es una medida de insaturación de grasas y aceites.

Todos los rasgos mostraron un patrón de distribución continua alrededor de la media, aunque algunos de los rasgos no siguieron una distribución normal perfecta (datos no mostrados). La distribución de frecuencia de IV, C16:0, C18:0, C18:1 y C18:2 no difirió significativamente de la normalidad evaluada mediante la estadística de Shapiro-Wilk calculada usando el programa estadístico SPSS. Sin embargo, la distribución de frecuencia de C14:0 y C16:1 mostró desviación de la normalidad. La desviación de un rasgo desde una distribución normal perfecta ha sido observada en experimentos de análisis de QTL (Septiningsih *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 107:1433-1441, 2003).

Los coeficientes de correlación entre los diferentes rasgos y sus valores también han sido calculados y se proveen en la Tabla 4. El contenido de IV como se esperaba, está correlacionado positivamente con ácidos grasos insaturados, C18:1 y C18:2. Los resultados también indican que los ácidos grasos saturados, C14:0 y C16:0 están negativamente correlacionados con IV, C18:1 y C18:2. Los resultados obtenidos aquí son como se esperaban y similares a aquellos reportados previamente (Rajanaidu *et al*, *Palm Oil Research Institute (PORIM) Bulletin* 7:9-20, 1983; Sambanthamurthi *et al*, *Journal of Oil Palm Research* 24-33, 1999). La correlación esperada observada es una buena indicación de la precisión de las medidas de ácidos grasos y IV realizadas en este estudio, lo cual es un criterio extremadamente importante para la detección de QTL.

Análisis de QTL

Se realizó el análisis de QTL para cada uno de los rasgos medidos usando el método de mapeo de intervalo implementado por MapQTL versión. 4.0 (Ooijen, MapQTL 4.0: Software para el cálculo de la posición de QTLs en el mapa genético. Wageningen, 2002).

En un umbral significativo amplio genómico de $P < 0.01$ y $P < 0.05$, se detectaron los QTLs significativos para IV, C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1 (Tabla 5). No se detectaron QTLs significativos para C18:2. Se determinó que el umbral amplio genómico significativo para el contenido de IV era de 4.7 para $P < 0.01$ y 3.8 para $P < 0.05$. En este umbral, un QTL significativo para IV fue mapeado en el Grupo 1 (Figura 3A). Los QTLs para C16:0 y C18:1 fueron mapeados en el mismo grupo (Tabla 5, Figura 3D y 3H). Los tres QTLs mostraron perfiles de probabilidad de forma similar, sugiriendo que el mismo QTL puede ser influyente en los tres rasgos. El hecho que los rasgos están significativamente correlacionados (Tabla 4) soporta adicionalmente esta suposición. IV es una medida de insaturación de aceites y grasas, C18:1 es el ácido graso insaturado más abundante mientras que C16:0 es el ácido graso saturado más abundante en el aceite de palma. Como tal, no es de sorprender que los mismos locus podrían estar influenciando los tres rasgos. Los QTLs mapeados en el Grupo 1 explican una porción significativa de la variación observada para rasgos que es 35.6% para IV, 28.3% para C18:1 y 36.8% para C16:0 (Tabla 5).

Los QTLs también se detectaron en los niveles de umbral de significancia $P < 0.01$ para C14:0 (en los Grupos 4 y 12), C16:1 (Grupo 12) y C18:0 (Grupos 3 y 12). Se detectaron QTLs significativos para C16:1 y C18:0 alrededor de la misma región en el Grupo 12. Esto apunta probablemente a otros locus importantes que influyen la composición de ácido graso. En la ruta de síntesis de ácido graso, C18:0 es convertido a C18:1, por las acciones de una enzima desaturasa conocida como estearoil ACP desaturasa (Sambanthamurthi *et al*, *Journal of Oil Palm Research*: 24-33, 1999). Esta enzima, aunque altamente específica para la conversión de C18:0 a C18:1, es también conocida por actuar algunas veces en C16:0 como sustrato pobre y convertirlo en C16:1 (Sambanthamurthi *et al*, *Journal of Oil Palm Research* 24-33, 1999). Esto explica probablemente la fuerte correlación ($r = -0.734$) entre

C18:0 (ácido esteárico) y C16:1 (ácido palmitoléico). Esto probablemente también explica porqué el mismo QTL puede estar influenciado ambos rasgos. El perfil de probabilidad para los QTLs que afectan ambos rasgos en el Grupo 12 (Figura 3E y 3G) también es muy similar agregando fuerza adicional al argumento que los mismos locus están influenciando ambos rasgos. Para C18:0, también se detectó un QTL adicional, que explica un 18.9% adicional de la variación fenotípica en el Grupo 3 (Tabla 5).

Se encontró que el rasgo C14:0 no se correlacionaba con C18:0 (a un nivel de significancia de $P < 0.05$) en la población de mapeo de híbrido interespecífico usada en este estudio, pero el QTL para el rasgo se superpone con C18:0 en el Grupo 12. La superposición de las posiciones del mapa de los QTLs para rasgos diferentes y no relacionados se ha reportado previamente, y puede ser causado por un solo gen con efectos pleiotrópicos (Schneider *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 104:1107-1113, 2002). Para C14:0, el QTL detectado en el Grupo 12 equivalió al 21.7% de la variación total, mientras que el QTL adicional detectado en el Grupo 4 explicó otro 20.9% de la variación total.

Además del Mapeo de Intervalo, también se usó la prueba de suma de rangos de Kruskal-Wallis para detectar marcadores con ligamientos para QTLs específicos. Esto fue para establecer si había un acuerdo entre ambas pruebas (Mapeo de Intervalo y Kruskal-Wallis). La prueba de Kruskal-Wallis está considerada como el equivalente no paramétrico del análisis de varianza en una vía (Ooijen y Maliepaard, MapQTL™ versión 3.0: Software para el cálculo de posiciones de QTL en mapas genéticos. CPRO-DLO, Wageningen, 1996), y también se realizó usando el software MapQTL. Los resultados también se resumieron en la Tabla 5. Generalmente, los resultados de ambos análisis estaban de acuerdo. Para todos los rasgos, los marcadores con el puntaje LOD más grande en el grupo de ligamiento (que están cerca a la posición estimada del QTL), también mostraron significancia muy alta para la presencia de un

QTL de segregación en la prueba de Kruskal-Wallis. Las dos pruebas parecen apuntar a un locus común que influencia QTLs asociados con la composición de ácido graso.

Se detectaron ocho (8) QTLs para IV y los cinco componentes de la composición de ácido graso (C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1) en tres grupos de ligamiento diferentes. Como no se ha realizado un trabajo similar para la palma de aceite antes de este, no se pudo hacer una comparación directa con los hallazgos de otros grupos de investigación. Sin embargo, es posible una comparación con otras cosechas (principalmente cosechas anuales). Por ejemplo en el maíz, Alrefai *et al*, *Genome* 38:894-901 (1995) detectó 15 QTLs (en ocho grupos) asociados con C16:0 solamente. Igualmente, Mangolin *et al*, *Euphytica* 137:251-259 (2004) detectó 13 QTLs, distribuidos en ocho cromosomas, para el contenido de aceite de nuez de palma en el maíz. El bajo número de QTLs detectados, en este estudio, estaba sin embargo de acuerdo con el trabajo de Somers *et al*, *Theoretical and Applied Genetics* 96:897-903 (1998) y Jourden *et al*, *Euphytica* 90:351-357 (1996), que encontró que unos pocos loci de QTL podrían explicar una gran proporción de la variación fenotípica asociada con uno de los componentes de ácido graso, C18:3 (ácido linolénico) en *Brassica napus*. Sin embargo, es importante notar que las diferencias en los QTLs mapeados en esta investigación no pueden ser comparadas directamente con las reportadas anteriormente debido a la cosecha diferente, tipo de marcadores, estructura de la población de mapeo y la densidad de los mapas genéticos usados en el análisis.

Ejemplo 8

Segregación de marcadores asociados con QTLs

Este estudio también correlacionó la segregación real de los marcadores (que apuntaban a la posición de los QTLs) y los rasgos de interés en la población de

mapeo. Como se usó la estrategia de pseudo-cruzamiento de prueba en la construcción del mapa, separamos palmas en la población de mapeo a aquellas que tenían la banda presente ("ab") o banda ausente ("aa") para un marcador particular que apunta a un QTL. Los valores del rasgo fueron promediados y comparados entre palmas con los genotipos "aa" y "ab". Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 6. Como se muestra para el marcador de RFLP CB75A (SEQ ID NO: 3) [Este corresponde a la secuencia No. 3 en la lista de sondas de RFLP] hubo una diferencia significativa para IV entre palmas que tienen los genotipos "aa" y "ab". La ausencia de la banda de (aa) CB75A produjo altos niveles de IV en otras palabras, altos niveles de instauración del aceite. Se observaron resultados similares para C18:1.

La sonda de RFLP CB75A también estaba asociada con el QTL para C16:0 (ácido palmítico). Realizando un análisis similar, hubo una diferencia significativa en el contenido de C16:0 entre palmas que tienen los genotipos "ab" y "aa". En este caso, la presencia de la banda de RFLP produjo niveles más altos del ácido graso saturado C16:0. Los resultados indican que la presencia de la banda CB75A apunta a un nivel mayor de ácido graso saturado (C16:0), niveles menores de instauración (menor lectura de IV). De manera similar, los rasgos C16:1 y C18:0 estaban correlacionados negativamente y los QTLs se superpusieron en la misma posición en el Grupo 12. La presencia del alelo SSR, P4T8 (que apunta hacia la posición estimada del QTL) produjo altos niveles de C18:0, pero niveles reducidos de C16:1.

Ejemplo 9

Validación de sonda CB75A en palmas independientes

La sonda CB75A fue evaluada en 13 palmas independientes, par alas cuales el contenido de C16:0, C18:1 y IV había sido determinado ya previamente. Los resultados se muestran en la Figura 4.

Las palmas estaban distribuidas con el fin de aumentar el contenido de C16:0 que también indica que las palmas están en orden para cantidades descendentes de contenido de C18:1 y IV. La sonda fue capaz de distinguir palmas que contienen alto y bajo contenido de C16:0, C18:1 y IV.

Validación de Sondas RD56 y marcador SSR P4T8 en una segunda población de mapeo

También se usó una segunda población de mapeo (auto de la palma *E. guineensis* T128), para detectar los QTLs asociados con C14:0 y C16:1. los resultados para el análisis de QTL se presentan en la Figura 5. Generalmente, los mismos marcadores, RD56 (SEQ ID NO:56) [NOTA: esto corresponde a la secuencia No. 56 en la lista de sondas de RFLP] y P4T8 [Nota: la secuencia cebadora se provee en el Adjunto 2], estaban asociados con el contenido de C14 y C16:1 en la segunda población de mapeo.

La asociación de los marcadores con contenido de C14:0 y C16:1 se ilustra adicionalmente en la Tabla 7 y 8.

Los resultados presentes apuntan a la verificación de los marcadores asociados con el contenido de C14:0 y C16:1, en donde los marcadores son capaces de distinguir palmas con alto y bajo contenido de C14:0 y C16:1.

Ejemplo 10

Cultivo Molecular para la calidad del aceite

La presente invención, por primera vez, ha revelado QTLs asociados con IV y FAC en la palma de aceite. Se identificaron marcadores que explican una gran proporción de la variación fenotípica (hasta 45% para C14:0, C16:0, C16:1,

C18:0 y C18:1). Los rasgos fueron en gran parte controlados por un número limitado de regiones genómicas con grandes efectos.

La identificación de QTLs provee herramientas importantes a cultivadores para manipular el contenido de FAC en la palma de aceite. Por ejemplo, la ausencia de la sonda de RFLP, CB75A, es indicativa de palmas que tienen aceite con niveles de instauración mayores. La ausencia del marcador de RFLP produjo un aumento de aproximadamente 2.6% por encima de la media de la familia para IV (nivel de instauración), y un descenso de aproximadamente 6.5% por debajo de la media de la familia para el contenido de C16:0 (ácido graso saturado).

Aunque los esfuerzos en Malasia están en gran parte dirigidos a disminuir los niveles de insaturación, el aumento de niveles de ciertos ácidos grasos saturados puede tener también algunos beneficios económicos. En este aspecto, existe un interés en aumentar el contenido de ácido esteárico (C18:0), que puede dar lugar a nuevas aplicaciones tales como, sustitución de manteca de cacao y productos de cuidado personal tales como lociones, cremas de afeitar y aceites para masajes (Parveez, AgBiotechNet, 5: Julio, ABN 113, 2003). Esto está también parcialmente motivado por el diferencial del precio sustancial de la manteca de cacao y los aceites de uso generalizado (Cheah, *Palm Oil Developments* 20:28-34, 1994). La palma de aceite como los aceites de la mayoría de las plantas, tiene bajo contenido de estearato de aproximadamente 2% (Sambanthamurthi *et al*, *Journal of Oil Palm Research*:24-33, 1999). El marcador SSR, P4T8, podría jugar un papel importante en MAS para palmas altas en estearato. La presencia de los alelos de SSR produjo un aumento de 6.8% por encima de la media de la familia para el contenido de C18:0.

BIBLIOGRAFÍA

- Alrefai *et al.* *Genome* 38:894-901, 1995.
- Barre *et al.* *Cytometry* 24:32-38, 1996.
- Billotte *et al.* *Genome* 44:413-425, 2001.
- Billotte *et al.* *Theoretical and Applied Genetics* 110: 754-765, 2005.
- Brachet *et al.* *Molecular Ecology* 8:160-163, 1999.
- Cheah y Rajinder Project Completion Report No. 0057/98, 16th July 1999. Malaysian Palm Oil Board (MPOB).
- Cheah Project Completion Report No. 0011/95, 4th July 1996. Malaysian Palm Oil Board (MPOB).
- Cheah *Palm Oil Developments* 20: 28- 34, 1994.
- Chin *et al.*, *Palm Oil International Conference*, Malaysian Palm Oil Board, pp: 36-50, 2003.
- Chua *et al.* *Scientific Meeting*, pp 127, Melaka, Malaysia 19th -21 st July 2004.
- Corley y Tinker, *The Oil Palm* (4^a edición), pp:287-326. Blackwell Science, 2003.
- Doyle y Doyle *FOCUS* 12:13-15, 1990.
- Fisher *et al.* *Nucleic Acids Research* 24:4369-4371, 1996.
- Grattapaglia y Sederoff *Genetics* 137:1121-1137, 1994.
- Grattapaglia *et al.* *Theoretical and Applied Genetics* 90:933-947, 1995.
- Grando *et al.* *Theoretical and Applied Genetics* 106:1213-1224, 2003.
- Hartley, *The oil palm* (3^a edición), pp: 47-94, Longman, London, 1988.
- Hospital *et al.* *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1181-1189, 1997.
- Jourdren *et al.* *Euphytica* 90:351-357, 1996.
- Keim *et al.* *Crop Science* 37:537-543, 1997.
- Ky *et al.* *Theoretical and Applied Genetics* 101:669-676, 2000.
- Lande y Thompson. *Genetics* 124: 743-756, 1990.
- Lander y Kruglyak *Nature Genetics* 11:241-247, 1995.

- Latiff, *Advances in Oil Palm Research*, Volumen 1, pp:19-38, Malaysian Palm Oil Board (MPOB), 2000.
- Lespinasse *et al. Theoretical and Applied Genetics* 100: 127- 138, 2000.
- Maliepaard *et al. Theoretical and Applied Genetics* 97: 60-73, 1998.
- Mangolin *et al. Euphytica* 137:251-259, 2004.
- Maria *et al. Elaeis* 7:122-134, 1995.
- Marques *et al. Theoretical and Applied Genetics* 96:727-737, 1998.
- Marines *et al. Theoretical and Applied Genetics* 102:971-979, 2001.
- Matthews *et al. Crop Science* 41: 516-521, 2001.
- Mayes *et al. Genome* 40:116-122, 1997.
- Mayes *et al Molecular Breeding* 2: 175-180, 1996.
- Meunier y Boulin *Oleagineux* 30:5-8, 1975.
- Meunier y Hardon *Oil Palm Research*, pp: 127- 138, 1976.
- Moore *et al. Bio/Technology* 11:584-589, 1993.
- Moretzsohn *et al. Theoretical and Applied Genetics* 100:63-70, 2000.
- Oboh y Fakorede *Oleagineux* 44:509-513, 1989.
- Ooijen, MapQTL 4.0: Software para el cálculo de la posición de QTLs en el mapa genético. Wageningen, 2000.
- Ooijen y Voorrips JoinMap 3.0: Software para el cálculo de mapas de ligamiento genético. Wageningen, 2001.
- Ooijen y Maliepaard MapQTL™ versión 3.0: Software para el cálculo de posiciones de QTL en mapas genéticos. CPRO-DLO, Wageningen, 1996.
- Parveez, *AgBiotechNet*, 5: Julio, ABN 113, 2003.
- Pfaff y Kahl *Molecular Genetics and Genomics* 269:243-251, 2003.
- Rafalski, *et al. Non-mammalian Genomic Analysis- A Practical Guide*, ed: B. Birren, y E. Lai, San Diego, Academic Press, 1996.
- Rajanaidu *Elaeis oleifera collection in Central and South America. Proceedings of International Workshop on Oil Palm Germplasm and Utilisation*, 26-27 March 1985, Selangor, Malaysia.

- Rajanaidu, N. *Major developments in oil palm (Elaeis guineensis) breeding*. Proceedings of the 12th Plenary Meeting of Association for the Taxonomic Study of the Flora of Tropical Africa (AETFAT), pp 39-52, Mitteilungen Inst. Allg. Bot. Hamburg, Alemania, 1990.
- Rajanaidu et al., *In Advances in Oil Palm Research*, Volumen 1, pp:171-237, Malaysian Palm Oil Board, 2000.
- Rajanaidu et al. *Palm Oil Research Institute (PORIM) Bulletin* 7:9-20, 1983.
- Rajapakse et al. *Theoretical and Applied Genetics* 103:575-583, 2001.
- Ranee et al. *Theoretical and Applied Genetics* 103:1302-1310, 2001.
- Rao et al. *PORIM Occasional Paper* 9: 1-28, 1983.
- Rival et al. *Plant Breeding* 117:73-76.
- Rozen y Skaletsky *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, pp: 365-386, 2000.
- Sambanthamurthi et al. *Journal of Oil Palm Research*: 24-33. 1999.
- Sambanthamurti et al. *Advances in Oil Palm Research*, Volume 1, pp: 284-331, 2000.
- Sambrook et al. *A Laboratory manual*, (2ⁿ edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.
- Schneider et al. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1107-1113, 2002.
- Septiningsih et al, *Theoretical and Applied Genetics* 107:1433-1441, 2003.
- Shah et al. *Theoretical and Applied Genetics* 89:713-718, 1994.
- Simone et al. *Molecular Breeding* 3 :415-425, 1997.
- Somers et al. *Theoretical and Applied Genetics* 96:89'-903, 1998.
- Stam *The Plant Journal* 3: 739-744, 1993.
- Strauss et al *Can J For Res* 22: 1050-1061, 1992.
- Suheimi y Lubis *Bulletin Pusat Penelitian Marihat* 5:37-44, 1985.
- Tanksley et al *Genetics* 132: 1141-1160, 1992.
- Vilanova et al. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 239-247, 2003

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de dicha planta, dicho método comprende detectar la presencia o ausencia de un marcador genético en la planta, dicho marcador genético corresponde a una secuencia de nucleótido que tiene al menos 90% de identidad para al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:3, o una secuencia complementaria a esta, en donde la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto y la ausencia de dicho marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC insaturado alto.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el marcador genético es CB75 A.
3. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el ácido graso saturado se selecciona del grupo que consiste de: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0).
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 50% del FAC total.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 60% del FAC total.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 70% del FAC total.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 80% del FAC total.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 90% del FAC total.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 95% del FAC total.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 98% del FAC total.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde el ácido graso insaturado es seleccionado del grupo que consiste de ácido oléico (C18:1), ácido linoléico (C18:2) y ácido alfa-linoléico (C18:3).
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, en donde el FAC insaturado es mayor de 20% del FAC total.
13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, en donde el FAC insaturado es mayor de 30% del FAC total.
14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, en donde el FAC insaturado es mayor de 40% del FAC total.
15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, en donde el FAC insaturado es mayor de 50% del FAC total.
16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, en donde el FAC insaturado es mayor de 60% del FAC total.

17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, en donde el FAC insaturado es mayor de 70% del FAC total.
18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, en donde el FAC insaturado es mayor de 80% del FAC total.
19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, en donde el FAC insaturado es mayor de 90% del FAC total.
20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, en donde el FAC insaturado es mayor de 95% del FAC total.
21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, en donde el FAC insaturado es mayor de 98% del FAC total.
22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, en donde el nivel de ácido oléico es 60%.
23. El método de la reivindicación 22, en donde el nivel de ácido palmítico es 25%.
24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en donde la ausencia del marcador genético es indicativo adicional de una planta que tiene un alto valor de yodo (IV).
25. El método de la reivindicación 24, en donde el IV es mayor de 60.
26. El método de la reivindicación 24, en donde el IV es mayor de 70.
27. El método de la reivindicación 24, en donde el IV es mayor de 80.

28. El método de la reivindicación 24, en donde el IV es mayor de 90.
29. El método de la reivindicación 24, en donde el IV es mayor de 95.
30. El método de la reivindicación 24, en donde el IV es mayor de 98.
31. Un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de dicha planta, dicho método comprende detectar la presencia o ausencia de un marcador genético en la planta, dicho marcador genético corresponde a una secuencia de nucleótido que tiene al menos 90% de identidad para al menos 20 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:56, o una secuencia complementaria a esta, en donde la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto y la ausencia de dicho marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC insaturado alto.
32. El método de la reivindicación 31, en donde el marcador genético es RD56.
33. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31 y 32, en donde el ácido graso saturado es ácido mirístico.
34. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31 y 32, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 50% del FAC total.
35. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31 y 32, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 60% del FAC total.

36. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31 y 32, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 70% del FAC total.
37. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31 y 32, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 80% del FAC total.
38. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31 y 32, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 90% del FAC total.
39. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31 y 32, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 95% del FAC total.
40. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31 y 32, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 98% del FAC total.
41. Un método para seleccionar una planta con base en el contenido de ácido graso (FAC) del aceite aislado de dicha planta, dicho método comprende detectar la presencia o ausencia de un marcador genético en la planta, dicho marcador genético corresponde a una secuencia de nucleótido que tiene al menos 90% de identidad a los nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:65, o una secuencia complementaria a esta, en donde la presencia del marcador genético es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC saturado alto y la ausencia de dicho marcador es indicativa de una planta que tiene aceite con un FAC insaturado alto.
42. El método de la reivindicación 41, en donde el marcador genético es P4T8.
43. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el ácido graso saturado es ácido esteárico.

44. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 50% del FAC total.
45. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 60% del FAC total.
46. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 70% del FAC total.
47. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 80% del FAC total.
48. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 90% del FAC total.
49. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 95% del FAC total.
50. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el nivel de FAC saturado es mayor de 98% del FAC total.
51. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el ácido graso insaturado de ácido palmitoléico (C16:1).
52. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el FAC insaturado es mayor de 20% del FAC total.
53. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el FAC insaturado es mayor de 30% del FAC total.

54. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el FAC insaturado es mayor de 40% del FAC total.
55. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el FAC insaturado es mayor de 50% del FAC total.
56. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el FAC insaturado es mayor de 60% del FAC total.
57. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el FAC insaturado es mayor de 70% del FAC total.
58. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el FAC insaturado es mayor de 80% del FAC total.
59. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el FAC insaturado es mayor de 90% del FAC total.
60. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el FAC insaturado es mayor de 95% del FAC total.
61. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 41 y 42, en donde el FAC insaturado es mayor de 98% del FAC total.
62. Una molécula de ADN asociada con FAC homólogo o complementario a la molécula de ADN revelada en la SEQ ID NO:3 localizada en el grupo de ligamiento 1 de la población de mapeo de T128, una palma de aceite de la especie *Elaeis guineensis* o progenie de la misma y es de una longitud suficiente para ser útil como un marcador de ADN de un alelo de un locus de

rasgo cuantitativo, en donde el alelo determina el contenido de FAC de una planta.

63. Una molécula de ADN asociada con FAC homólogo o complementario a la molécula de ADN revelada en la SEQ ID NO:56 localizada en el grupo de ligamiento 12 de la población de mapeo de T128, una palma de aceite de la especie *Elaeis guineensis* o progenie de la misma, y es de una longitud suficiente para ser útil como un marcador de ADN para un alelo de un locus de rasgo cuantitativo, en donde el alelo determina el contenido de FAC de una planta.

64. Una molécula de ADN asociada con FAC homólogo o complementario a la molécula de ADN revelada en la SEQ ID NO:65 localizada en el grupo de ligamiento 12 de la población de mapeo de T128, una palma de aceite de la especie *Elaeis guineensis* o progenie de la misma, y es de longitud suficiente para ser útil como un marcador de ADN para un alelo de un locus de rasgo cuantitativo, en donde el alelo determina el contenido de FAC de una planta.

65. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 61, en donde la planta es planta de palma de aceite.

Tabla 1: Segregación de productos de amplificación AFLP en la progenie del cruce interespecífico de UP1026 (*E. oleifera*) x T128 (*E. guineensis*)

Loci definido por	Genotipos Parentales			Genotipos de la Progenie				Relación de Segregación Esperada	Marcadores de No Segregación		
	Tipo	Oleifera	Guineensis	1	2	3	4		AFLP	RFLP	SSR
Banda Sencilla	a	—		—	—			1:1	45	4	
	b		—	—		—		1:1	365	45	10
	c	—	—	—	—	—		3:1	8	-	-
Dos Alelos	d	—		—	—			1:1	-	1	1
	e		—	—		—		1:1	-	23	8
Tres Alelos	f	—		—		—		1:1:1:1	-	-	1
		—	—	—	—	—	—				
Cuatro Alelos	g	—		—	—			1:1:1:1	-	-	2
		—	—	—		—	—				

Tabla 2: Resumen del análisis de RFLP, SSR y AFLP de la población de mapeo híbrida interespecífica

Tipo de Marcadores	No. de pares sonda/cebador evaluados	No. de pares sonda informativa/ cebador evaluados	No. de loci polimórficos identificados	No. de marcadores que muestran segregación 3:1	No. de marcadores que muestran segregación 1:1 en los gametos de		No. de marcadores que cumplen bondad de ajuste a la relación 1:1 o 3:1
					T128	UP1026	
AFLP	67	67	418	8	365	45	319
RFLP	287	69	73	-	68	5	66
SSR	54	19	22	-	21	1	14
Total			513	8	454	51	399

Tabla 3: Locus de microsatélite reportados por Billotte *et al.* (2001)

<u>No.</u>	<u>Locus de SSR</u>	<u>Número de Acceso EMBL</u>
1.	mEgCIR0008	AJ271625
2.	mEgCIR0009	AJ271633
3.	mEgCIR0018	AJ271634
4.	mEgCIR0046	AJ271635
5.	mEgCIR0067	AJ271636
6.	mEgCIR0377	AJ271936
7.	mEgCIR1772	AJ271937

Tabla 4: Correlación entre ácidos (n=81) en progenie F₁

	<u>IV</u>	<u>C14:0</u>	<u>C16:0</u>	<u>C16:1</u>	<u>C18:0</u>	<u>C18:1</u>	<u>C18:2</u>
IV							
C14:0	-0.679**						
C16:0	-0.879**	0.716**					
C16:1	-0.169	0.278*	0.186				
C18:0	-0.143	-0.107	0.062	-0.734**			
C18:1	0.733**	-0.646**	-0.941**	-0.219	-0.33		
C18:2	0.517**	-0.301**	-0.199	-0.044	-0.123	-0.111	

Nota: correlación realizada usando la prueba de Correlación de Pearson implementada mediante el paquete de software SPSS.

** : la correlación es significativa al nivel 0.01 (2-colas)

* : la correlación es significativa al nivel 0.05 (2-colas)

3/12

Tabla 5: Se encontró que los QTLs para IV y composición de ácido graso es significativa en el umbral de mapeo ancho del genoma empírico

Rasgo	Nivel de umbral significativo ancho de genoma		Grupo	Marcadores más Cercanos	Posición (cM)	Puntaje LOD	Prueba de Kruskas-Wallis	% de varianza explicado
	P<0.05	P<0.01						
IV	3.8	4.7	1	CB75A	40	7.75	P=0.0001 (K=26.19)	35.6
C14:0	3.5	4.7	4	TAAC/HCAA-130	65	4.07	P=0.0005 (K=13.92)	20.9
			12	P4T8	22	4.25	P=0.0001 (K=18.59)	21.7
C16:0	4.6	5.7	1	CB75A	40	7.98	P=0.0001 (K=27.72)	36.8
C16:1	3.7	5.0	12	P4T8	22	10.53	P= 0.0001 (K=34.98)	45.5
C18:0	3.3	4.0	3	EACA/MCAG-219	40	3.59	P=0.0005 (K=12.57)	18.9
			12	P4T8	22	4.0	P=0.0001 (K=16.22)	20.6
C18:1	4.0	4.8	1	CB75A	40	5.71	P= 0.0001 (K=23.5)	28.3

Tabla 6: Correlación entre segregación de marcadores a QTLs y rasgos específicos (aa = ausente, ab = presente)

Rasgo	Marcador	Genotipo	Media ± SE
IV	CB75A	aa	73.26 ± 0.45 ^a
		ab	69.59 ± 0.36 ^b
C14:0	RD56	aa	0.25 ± 0.01 ^a
		ab	0.33 ± 0.02 ^b
C16:0	CB75A	aa	27.01 ± 0.40 ^a
		ab	30.79 ± 0.39 ^b
C16:1	P4T8	aa	0.52 ± 0.02 ^a
		ab	0.34 ± 0.01 ^b
C18:0	P4T8	aa	1.91 ± 0.04 ^a
		ab	2.19 ± 0.05 ^b
C18:1	CB75A	aa	55.15 ± 0.92 ^a
		ab	52.50±0.41 ^b

4/12

Las medias de los genotipos “aa” y “ab” se compararon usando la prueba t independiente mediante el paquete estadístico SPSS
Se encontró que las medias de los diferentes genotipos para los marcadores asociados con cada rasgo eran significativamente diferentes.

Tabla 7: Se encontró que los QTLs para composición de ácido graso (C14:0 y C:16:1) son significativos en el umbral de mapeo ancho del genoma empírico en la segunda población de mapeo.

Rasgo	Nivel de umbral significativo ancho del genoma		Grupo	Marcador más cercano	Posición (CM)	Puntaje LOD	Ad	Dom	Var (%)	Prueba K-W
	P<0.05	P<0.01								
C14:0	4.0	4.8	9	G16	18.5	5.29	-	-	22.3	P=0.0001 (K=20.35)
			12	RD56	66.9	9.85	0.178	0.0760	37.5	P=0.0001 (K=38.67)
			-	P4T8*	58	5.87	0.243	0.054		P=0.0001 (K=23.84)
							0.189	0.050		
C16:1	4.1	5.0	12	EACA/MCAA>330C	42.6	10.96	0.070	-0.010	45.7	P=0.0001 (K=25.41)
			-	RD56	66.9	5.91	0.047	0.004		P=0.0001 (K=24.28)
				P4T8*	58	5.31	0.044	0.003		P=0.005 (K=17.98)

Ad: Aditivo
Dom: Dominancia
%var: % de varianza explicado
K-W: prueba de Kruskal-Wallis
K: estática de prueba de Kruskal-Wallis

Tabla 8: Correlación entre segregación del marcador RD56 ligado al contenido de C:14 y C:16:1 en una segunda población de mapeo

Rasgo	Marcador	Genotipo	Media ± SE
C14:0 (%)	RD56	aa	0.328 ± 0.03 ^c
		bb	0.814 ± 0.04 ^d
		h	0.624 ± 0.04 ^e
C16:1 (%)	RD56	aa	0.111 ± 0.01 ^c
		bb	0.201 ± 0.01 ^d
		h	0.157 ± 0.01 ^e

Se compararon las medias de los genotipos “aa”, “h” y “bb” (para marcadores co-dominantes) usando la prueba de ANOVA en una vía y se compararon “aa” y “ab” (para marcadores dominantes) usando la prueba t independiente. Ambas pruebas fueron implementadas usando el paquete estadístico SPSS. Se encontró que las medias de los diferentes genotipos para los marcadores asociados con cada rasgo eran significativamente diferentes (indicadas por las letras c, d y e) a P<0.05.

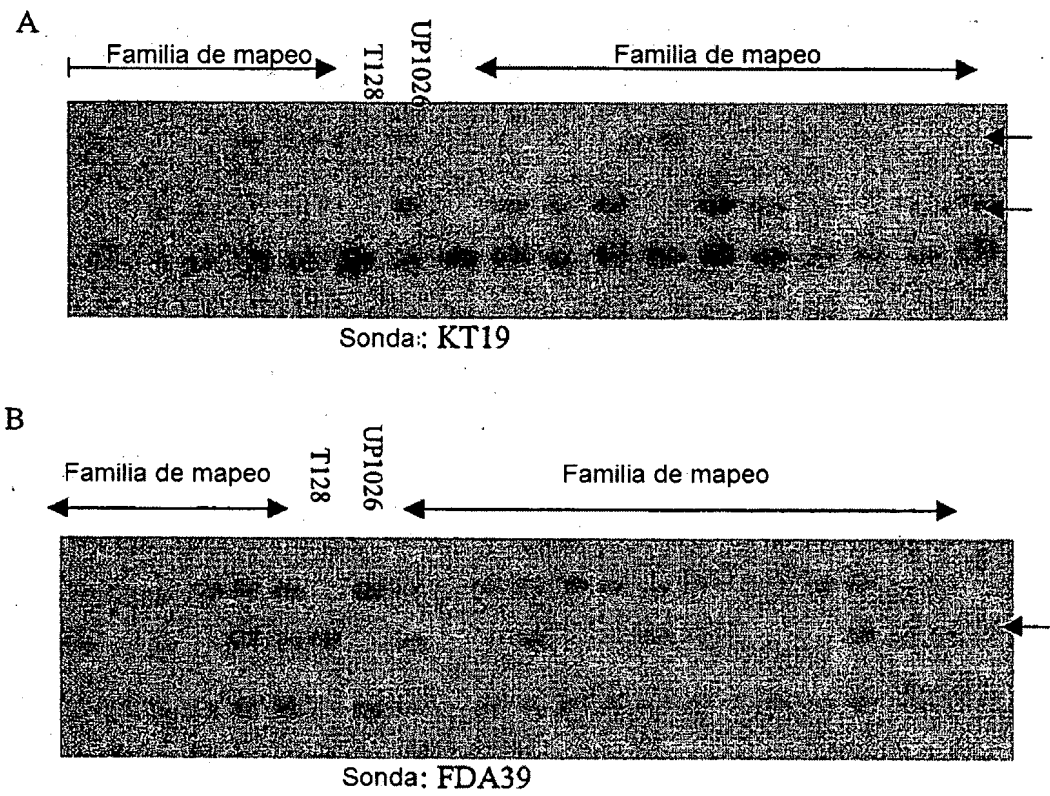
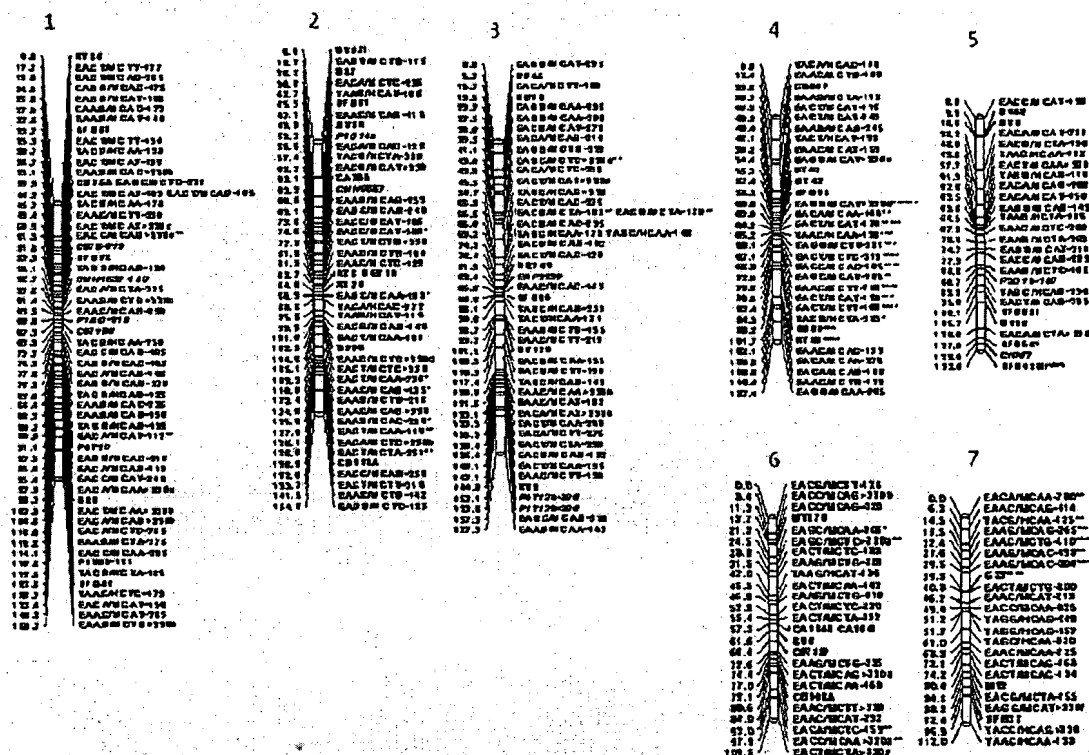


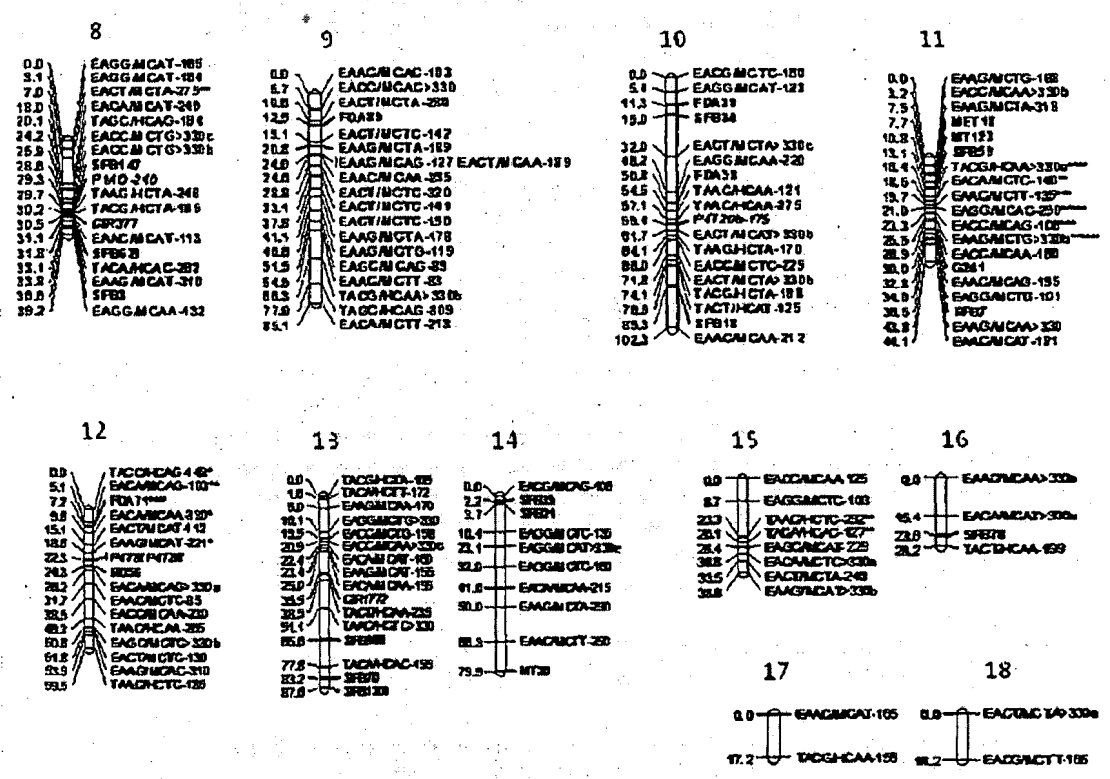
Figura 1: Autoradiogramas que muestran los loci de segregación revelados por los marcadores de RFLP KT19 (A), FDA39 (B), UP1026 y T128 son el parental femenino, *oleifera Colombiana* y el parental masculino, *guineensis Nigeriana*, respectivamente.

(←) indica bandas de segregación.

6/12

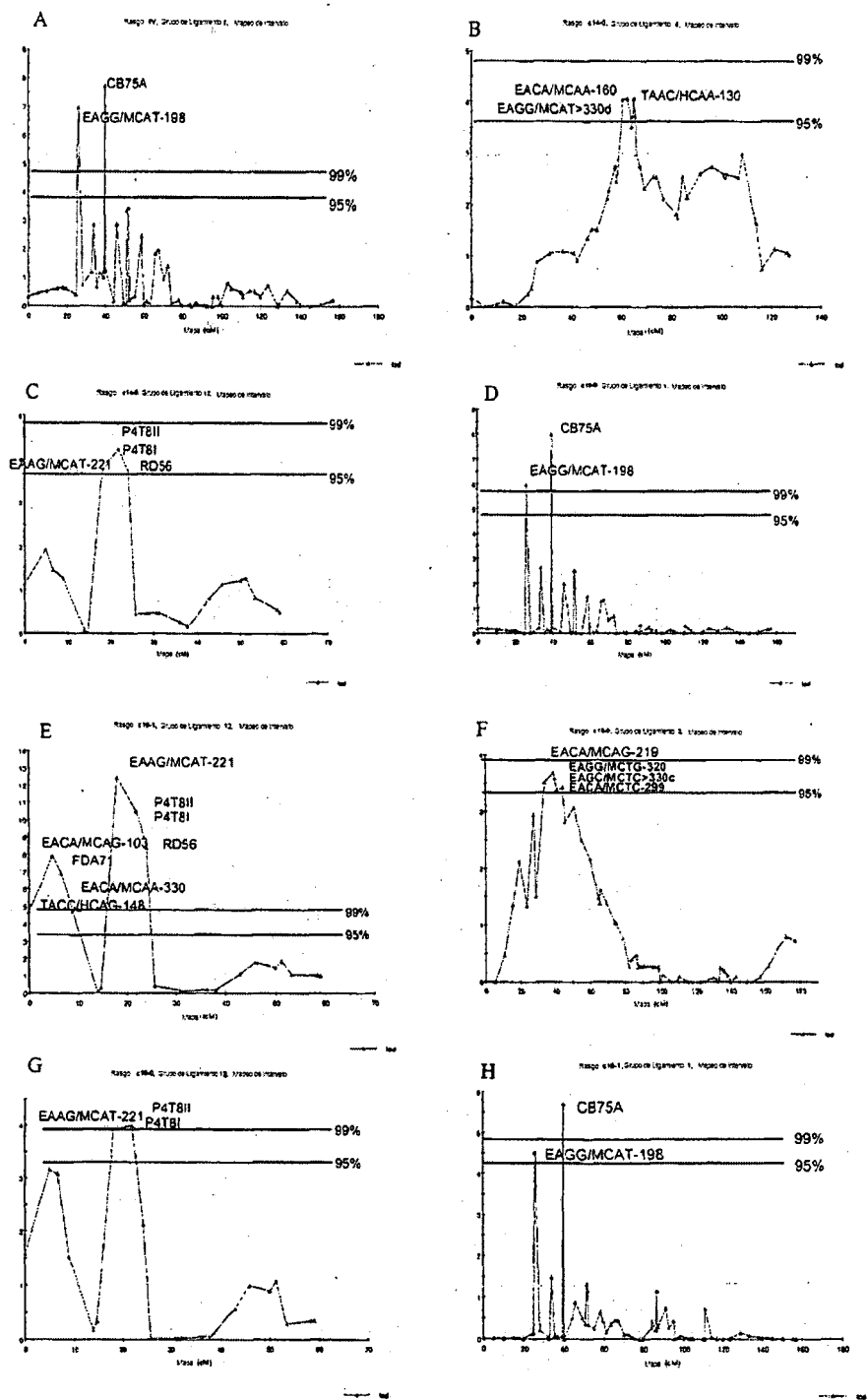
Figura 2: mapa de AFLP, RFLP y SSR combinados del híbrido interespecífico (Palma T128)





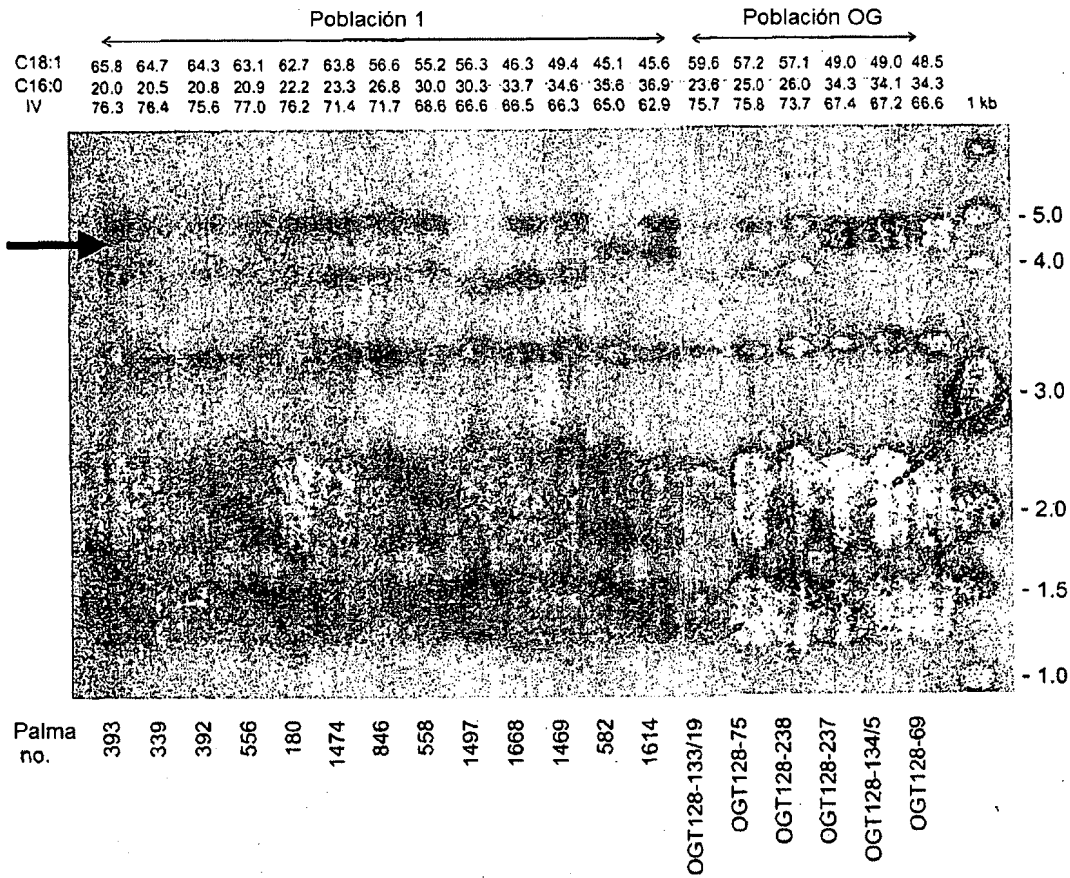
8/12

Figura 3: Gráficas de QTL para IV y composición de ácido graso (C14:0, C16:0, C16:1, C18:0)



9/12

Figura 4: Validación de Sonda CB75A en palmas independientes



10/12

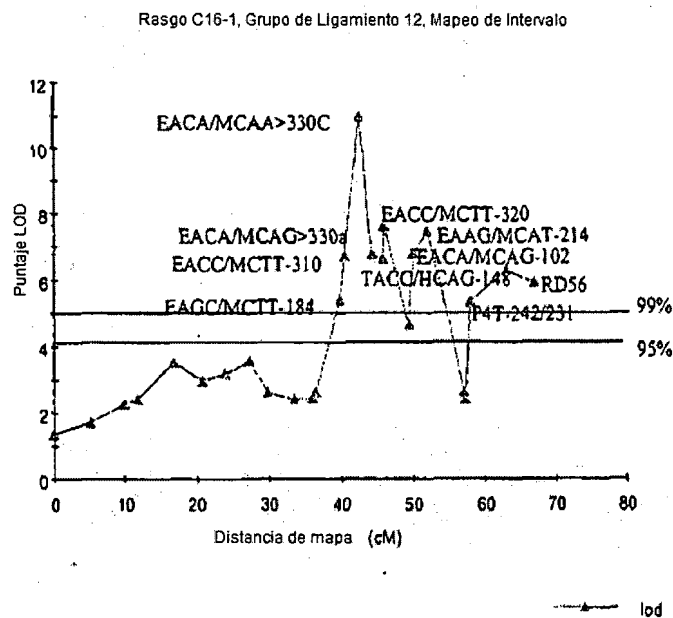
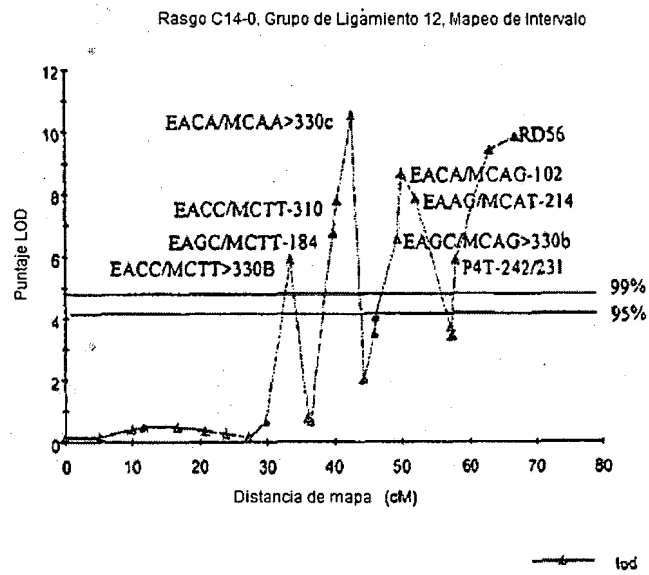


Figura 5: Gráficas de QTL para composición de ácido graso (C14:0 y C16:1) en la segunda población de mapeo. Los mismos marcadores RD56 y P4T8 parecen estar vinculados al contenido de C14:0 y C16:1

Adjunto 1

Conjuntos de cebador de microsatélite, secuencias de cebador y temperaturas de recocido óptimas

Conjuntos de Cebadores	Motivo	Secuencias de cebadores F: 5'-3' R: 5'-3'	No. de amplicones s	Tamaño del alelo polimórfico (bp)	Temperatura de recocido
P1A0	(GA) ₆	F: TGAGAGAGAGAG AGAGAGAGAG R: AGCGAGGTTGTTG CTCCTAAA	6	310	52°C
P1T6b	(CT) ₈ ...(CT) ₅	F: GGAGGCCGCCTAA TGAAAGAAATC R: AGAGAGAGAAGG GGAGGGAAGGAG	11	174 & 111	50°C
P1T12b	(GA) ₇	F: GTTATTTGAGAGA GAGAGAGAGAGA R: TGCCACTACGTGA AGAAGATAAAG	5	200	56°C
P4T8	(CT) ₄	F: GTAGGGGCTCTCT CTCTCTCTAT R: CATGCCCTGAGGA AATTCAG	4	245, 235, 230 & 220	52°C
P4T10	(CT) ₉	F: ACACGCACACAGA GAGATAGAGAG R: CTCGATTCTGAATA GGTAGTCACTG	6	128 & 125	52°C
P4T12a	(GA) ₈	F: GTTATTTGAGAGA GAGAGAGAG R: TGCCACTACGTGA AGAAGATAAAG'	9	200	52°C

12/12

P4T20b	(GA) ₈	F: TGAAAGACTCTCT CTCTCT R: TCAGCTTTGAATT ATCCCATCC	5	175	50°C
P1O14a	(GA) ₆	F: TTTTCGAGAGAGA GAGAGAGAGAGA R: CAAGGATTTAATA GCCACCCA TAG	7	215 & 205	50°C
P201b	(GA) ₄ C A(GA) ₄	F: CCC ACG AAA ACC CTA GAA AAA R: GTGTGCGTGTAGT TCATTGTTTTG	7	190	54°C
CNH08 87	(AT) ₉	F: TTATTG ATTGAT GCAAGATACAC R: TTGATAAAAATAC AAGAGATAGCA	7	165 & 159	52°C
CNH15 37	(GA) ₂₃	F: ATT TGC ATG TTT ATG TGT CC R: AAATCATCCTCCT ATGTC TCT TT	8	140, 137 ^a & 132 ^a	52°C
EAP333 9	(AG) ₁₅	F: GATTGTTTAGAAA TGCCAATAAG R: GTACTGACACCA AGACAAAA	4	172, 170 & 182 ^a	54°C

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA	
RELACIÓN DE ANEXOS			
Dependencia:		Fecha:	Recorrido:
Tipo de Radicación:	Entrada:	Salida:	Traslado:
Convenio:			Planilla:
Radicador:			

ID	No. Radicación	Cons	Item
1	12-12-2013		
2	12-12-2013		
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			

Item	Unidad de Conservación
1	CD
2	Disquetes
3	DVD
4	Fotos
5	Libro
6	Muestra Física
7	Otros
8	Planos
9	Periódico
10	Publicación Periódica
11	Sobre blanco tamaño carta
12	Sobre blanco tamaño oficio
13	Sobre de manila

Observaciones
Folio 70 sobre de manila "Listado de Secuencia formato digital"

IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS CON COMPOSICIÓN DE ÁCIDO GRASO EN PLANTAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Se construyó un mapa a partir del análisis de AFLP, RFLP y SSR de la progenie derivada de un cruce interespecífico que involucra una *Elaeis oleifera* Colombiana (UP 1026) y una *E. guineensis* Nigeriana (T128). Este cruce interespecífico se usó para mapear genes asociados con la calidad del aceite. Se generó un mapa marco para el parental masculino, T128, usando Joinmap ver. 3.0. En el mapa del parental *guineensis*, 389 marcadores (305 AFLP, 64 RFLP y 20 SSR) estaban ordenados en 18 grupos de ligamiento (1571cM). El mapa de *E. guineensis* también se usó en la exploración para loci de rasgos cuantitativos (QTLs) que controlan la calidad del aceite (medida en términos de valor de yodo y composición de ácido graso). A un nivel de umbral ancho genómico significativo del 99%, se detectaron los QTLs asociados con valor de yodo (IV), C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1. La misma región genómica parece estar influenciando el contenido de IV, C18:1 y C16:0. Los datos observados se soportan adicionalmente al considerar que los tres rasgos están fuertemente correlacionados. Los QTLs también explican una proporción significativa (aproximadamente 35%) de la variación observada. QTLs igualmente significativos para C16:1 y C14:0 se detectaron alrededor de los mismos locus en la región genómica separada. Esto apunta probablemente a otros locus importantes que influyen la composición de ácido graso. Los marcadores asociados con IV y FAC (C14:0, C16:0, C16:1 y C18:1) fueron confirmados en una segunda población de mapeo o en palmas de diferente genotipo. Los marcadores involucrados son sondas de RFLP, a saber CB75A (para IV, C16:0, C18:1) y RD56 (para C14:0 y C16:1) y el marcador de microsatélite (SSR) P4T8 (C18:0 y C16:0).

SECTOR: Industria del aceite de palma, específicamente, método para selección de plantas en función de su contenido de ácidos grasos, el cual utiliza secuencias de nucleótidos como marcadores genéticos para realizar dicha selección.

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 24-07-12 (30) Prioridad (31) No. Prioridad PI2010000118 (32) Fecha 11-01-10 (33) País MY.	(51) Int Cl: C12Q 1/68 (71) Solicitante(s): MALAYSIAN PALM OIL BOARD (72) Inventor(es): HARMINDER SINGH, Rajinder Singh; CHEAH, Suan Choo; ABD. RAHMAN, Rahimah y OOI, Cheng Li, Leslie (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 11-08-12 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 07-01-11 No. de solicitud PCT/MY2011/000003	(87) Publicación internacional Fecha: 14-07-11 No. publicación: WO 2011/084047 A3
(54) Titulo: "IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS CON COMPOSICIÓN DE ÁCIDO GRASO EN PLANTAS"	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

Se construyó un mapa a partir del análisis de AFLP, RFLP y SSR de la progenie derivada de un cruce interespecífico que involucra una *Elaeis oleifera* Colombiana (UP 1026) y una *E. guineensis* Nigeriana (T128). Este cruce interespecífico se usó para mapear genes asociados con la calidad del aceite. Se generó un mapa marco para el parental masculino, T128, usando Joinmap ver. 3.0. En el mapa del parental *guineensis*, 389 marcadores (305 AFLP, 64 RFLP y 20 SSR) estaban ordenados en 18 grupos de ligamiento (1571cM). El mapa de *E. guineensis* también se usó en la exploración para loci de rasgos cuantitativos (QTLs) que controlan la calidad del aceite (medida en términos de valor de yodo y composición de ácido graso). A un nivel de umbral ancho genómico significativo del 99%, se detectaron los QTLs asociados con valor de yodo (IV), C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1. La misma región genómica parece estar influenciando el contenido de IV, C18:1 y C16:0. Los datos observados se soportan adicionalmente al considerar que los tres rasgos están fuertemente correlacionados. Los QTLs también explican una proporción significativa (aproximadamente 35%) de la variación observada. QTLs igualmente significativos para C16:1 y C14:0 se detectaron alrededor de los mismos locus en la región genómica separada. Esto apunta probablemente a otros locus importantes que influyen la composición de ácido graso. Los marcadores asociados con IV y FAC (C14:0, C16:0, C16:1 y C18:1) fueron confirmados en una segunda población de mapeo o en palmas de diferente genotipo. Los marcadores involucrados son sondas de RFLP, a saber CB75A (para IV, C16:0, C18:1) y RD56 (para C14:0 y C16:1) y el marcador de microsatélite (SSR) P4T8 (C18:0 y C16:0).

Sector: Industria del aceite de palma, específicamente, método para selección de plantas en función de su contenido de ácidos grasos, el cual utiliza secuencias de nucleótidos como marcadores genéticos para realizar dicha selección.

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
Industria y Comercio		DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES	
SUPERINTENDENCIA		TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION ____		PCT ☒	MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____
(21) No. de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 24-07-12	
(51) Clasificación Internacional: C12Q 1/68			
(71) Solicitante(s): MALAYSIAN PALM OIL BOARD			
(72) Inventor(es): HARMINDER SINGH, Rajinder Singh; CHEAH, Suan Choo; ABD. RAHMAN, Rahimah y OOI, Cheng Li, Leslie			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	PI2010000118	11-01-10	MY
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 11-07-12		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 14-07-11	
Fecha de presentación de la solicitud: 07-01-11		No. publicación: WO 2011/084047 A3	
No. de solicitud: PCT/MY2011/000003			
(54) Título: "IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS CON COMPOSICIÓN DE ÁCIDO GRASO EN PLANTAS"			

74

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO	
(21) No. de solicitud: (51) Clasificación Internacional: C12Q 1/68 (71) Solicitante(s): MALAYSIAN PALM OIL BOARD (72) Inventor(es): HARMINDER SINGH, Rajinder Singh; CHEAH, Suan Choo; ABD. RAHMAN, Rahimah y OOI, Cheng Li, Leslie (74) Apoderado: ALICIA LLORED A RICAURTE (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País PI2010000118 11-01-10 MY (22) Fecha de solicitud: 24-07-12 (85) Fecha límite inicio fase nacional: 11-08-12 (86) Datos relativos a presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 07-01-11 No. de solicitud: PCT/MY2011/000003 (87) Publicación internacional: Fecha: 14-07-11 No. Publicación: WO 2011/084047 A3	
(54) Título: "IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ASOCIADOS CON COMPOSICIÓN DE ÁCIDO GRASO EN PLANTAS"	
(57) Resumen - Reivindicación(es): Resumen.- Se construyó un mapa a partir del análisis de AFLP, RFLP y SSR de la progenie derivada de un cruce interespecífico que involucra una <i>Elaeis oleifera</i> Colombiana (UP 1026) y una <i>E. guineensis</i> Nigeriana (T128). Este cruce interespecífico se usó para mapear genes asociados con la calidad del aceite. Se generó un mapa marco para el parental masculino, T128, usando Joinmap ver. 3.0. En el mapa del parental <i>guineensis</i>, 389 marcadores (305 AFLP, 64 RFLP y 20 SSR) estaban ordenados en 18 grupos de ligamiento (1571cM). El mapa de <i>E. guineensis</i> también se usó en la exploración para loci de rasgos cuantitativos (QTLs) que controlan la calidad del aceite (medida en términos de valor de yodo y composición de ácido graso). A un nivel de umbral ancho genómico significativo del 99%, se detectaron los QTLs asociados con valor de yodo (IV), C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1. La misma región genómica parece estar influenciando el contenido de IV, C18:1 y C16:0. Los datos observados se soportan adicionalmente al considerar que los tres rasgos están fuertemente correlacionados. Los QTLs también explican una proporción significativa (aproximadamente 35%) de la variación observada. QTLs igualmente significativos para C16:1 y C14:0 se detectaron alrededor de los mismos locus en la región genómica separada. Esto apunta probablemente a otros locus importantes que influyen la composición de ácido graso. Los marcadores asociados con IV y FAC (C14:0, C16:0, C16:1 y C18:1) fueron confirmados en una segunda población de mapeo o en palmas de diferente genotipo. Los marcadores involucrados son sondas de RFLP, a saber CB75A (para IV, C16:0, C18:1) y RD56 (para C14:0 y C16:1) y el marcador de microsatélite (SSR) P4T8 (C18:0 y C16:0). Sector: Industria del aceite de palma, específicamente, método para selección de plantas en función de su contenido de ácidos grasos, el cual utiliza secuencias de nucleótidos como marcadores genéticos para realizar dicha selección.	

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
14 July 2011 (14.07.2011)

(10) International Publication Number
WO 2011/084047 A3

PCT

- (51) International Patent Classification:
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/92 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/MY2011/000003
- (22) International Filing Date:
7 January 2011 (07.01.2011)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
PI2010000118 11 January 2010 (11.01.2010) MY
- (71) Applicant (for all designated States except US):
MALAYSIAN PALM OIL BOARD [MY/MY]; 6, Persiaran Institutsi, Bandar Baru Bangi, 43000 Kajang, Selangor (MY).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **HARMINDER SINGH, Rajinder Singh** [MY/MY]; c/o Malaysiona Palm Oil Board, 6, Persiaran Institutsi, Bandar Baru Bangi, 43000 Kajang, Selangor (MY). **CHEAH, Suan Choo** [MY/MY]; c/o Malaysiona Palm Oil Board, 6, Persiaran Institutsi, Bandar Baru Bangi, 43000 Kajang, Selangor (MY). **ABD. RAHMAN, Rahimah** [MY/MY]; c/o Malaysiona Palm Oil Board, 6, Persiaran Institutsi, Bandar Baru Bangi, 43000 Kajang, Selangor (MY). **OOI, Cheng Li, Leslie** [MY/MY]; c/o Malaysiona Palm Oil Board, 6, Persiaran Institutsi, Bandar Baru Bangi, 43000 Kajang, Selangor (MY).
- (74) Agent: **SHAARI, Zaraihan**; c/o Shearn Delamore & Co., 7th Floor, Wisma Hamzah-Kwong Hing, No. 1, Leboh Ampang, 50100 Kuala Lumpur (MY).

- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

- (88) Date of publication of the international search report:
2 February 2012

(54) Title: IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH FATTY ACID COMPOSITION IN PLANTS

(57) Abstract: A map was constructed from AFLP, RFLP and SSR analysis of the progeny derived from an interspecific cross involving a Colombian *Elaeis oleifera* (UP 1026) and a Nigerian *E. guineensis* (T128). This interspecific cross was used to map genes associated with oil quality. A framework map was generated for the male parent, T128, using Joinmap ver. 3.0. In the paternal *guineensis* map, 389 markers (305 AFLP, 64 RFLP and 20 SSR) were ordered in 18 linkage groups (1571cM). The *E. guineensis* map was also used in scanning for quantitative trait loci (QTLs) controlling oil quality (measured in terms of iodine value and fatty acid composition). At a 99 % significant genomic wide threshold level, QTLs associated with iodine value (IV), C14:0, C16:0, C16:1, C18:0 and C18:1 were detected. The same genomic region appears to be influencing IV, C18:1 and C16:0 content. Considering the three traits are strongly correlated further supports the data observed. The QTLs also explain a significant proportion (about 35%) of the variation observed. Similarly significant QTLs for C16:1 and C14:0 were detected around the same locus in separate genomic region. This probably points to another major locus influencing fatty acid composition. Markers associated with IV and FAC (C14:0, C16:0, C16:1 and C18:1) were confirmed in a second mapping population or in palms of different genotype. The markers concerned are RFLP probes, namely CB75A (for IV, C16:0, C18:1) and RD56 (for C14:0 and C16:1) and microsatellite (SSR) marker P4T8 (C18:0 and C16:0).

WO 2011/084047 A3

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT <i>The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.</i>
Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51 bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate: in relation to this international application, MALAYSIAN PALM OIL BOARD, is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following: MALAYSIAN PALM OIL BOARD is entitled as employer of the inventors HARMINDER SINGH, Rajinder Singh a/l; CHEAH Suan Choo, Dr.; ABD. RAHMAN, Rahimah and OOI Cheng Li, Leslie
☐ This declaration is continued on the following sheet; "Continuation of Box No. VIII (ii)".

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference SD3402153ZRS	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/MY2011/000003	International filing date (day/month/year) 07 JANUARY 2011 (07.01.2011)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 11 JANUARY 2010 (11.01.2010)
Applicant MALAYSIAN PALM OIL BOARD et al		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 3 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of :

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (See Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
- ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant.
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☒ none of the figure is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/MY2011/000003**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/29(2006.01)i, G01N 33/92(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models

Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS(KIPO internal), Pubmed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SINGH, R. et al. 'Mapping quantitative trait loci (QTLs) for fatty acid composition in an interspecific cross of oil palm' BMC Plant Biology. Vol. 9:114 (26 August 2009)	1-30, 41-65
A	See Table 3, 5, 9; Fig 3.	31-40
A	BILLOTTE, N. et al. 'Microsatellite-based high density linkage map in oil palm (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.)' Theoretical and Applied Genetics. Vol.110(4), pp.754-765 (26 January 2005) See the whole document.	1-65
A	BILLOTTE, N. et al. 'Development, characterisation, and across-taxa utility of oil palm (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.) microsatellite markers' Genome. Vol.44(3), pp.413-425 (June 2001) See the abstract.	1-65
PA	BILLOTTE, N. et al. 'QTL detection by multi-parent linkage mapping in oil palm (<i>Elaeis guineensis</i> Jacq.)' Theoretical and Applied Genetics. Vol.120(8), pp.1673-1687(25 February 2010) See the whole document.	1-65



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 NOVEMBER 2011 (28.11.2011)

Date of mailing of the international search report

30 NOVEMBER 2011 (30.11.2011)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsu-ro,
Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

KIM, JI YUN

Telephone No. 82-42-481-8288



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/MY2011/000003

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
None			

PCT/MY2011/000003

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

SHAARI, Zaraihan

c/o Shearn Delamore & Co. 7th Floor, Wisma Hamzah-
Kwong Hing, No.1, Leboh Ampang Kuala Lumpur 50100
Malaysia

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) 30 NOVEMBER 2011 (30.11.2011)

Applicant's or agent's file reference

SD3402153ZRS

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/MY2011/000003

International filing date (day/month/year)

07 JANUARY 2011 (07.01.2011)

Priority date(day/month/year)

11 JANUARY 2010 (11.01.2010)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/29(2006.01)i, G01N 33/92(2006.01)i

Applicant

MALAYSIAN PALM OIL BOARD et al

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189
Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon 302-
701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140



Date of completion of this opinion

28 NOVEMBER 2011 (28.11.2011)

Authorized officer

KIM, JI YUN

Telephone No.82-42-481-8288



WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/MY2011/000003

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of :
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of:
 - a. a sequence listing filed or furnished
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. time of filing or furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/MY2011/000003

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3-23,25-40,43-61	YES
	Claims	1,2,24,41,42,62-65	NO
Inventive step (IS)	Claims	31-40	YES
	Claims	1-30,41-65	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-65	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations :

1. The following document is referred to in this written opinion:

D1: SINGH, R. et al. 'Mapping quantitative trait loci (QTLs) for fatty acid composition in an interspecific cross of oil palm'
BMC Plant Biology. Vol. 9:114 (26 August 2009)

2. Novelty and Inventive Step [PCT Article 33(2) and 33(3)]

2.1 Claims 1, 2, 24 and 65 are directed to a method for selecting a plant based on fatty acid content (FAC) of oil by detecting the presence of a genetic marker CB75A (SEQ ID NO:3); and claim 62 is directed to a DNA molecule homologous or complementary to the sequence of SEQ ID NO: 3.

D1 discloses that in a study of segregation of genetic markers associated with quantitative trait loci (QTLs) the absence of the CB75A band resulted in high levels of IV(unsaturated FAC) and the presence of the CB75A band is correlated with a higher level of the saturated fatty acid in palm oil plant. D1 also discloses a nucleic acid sequence(GenBank GH159164) identical to the sequence shown in SEQ ID NO:3 of the present application.

Thus, the subject-matter of said claims is not novel over D1.

2.2 Claim 41 and claim 42 are directed to a method for selecting a plant based on FAC of oil by detecting the presence of a genetic marker P4T8 (SEQ ID NO:65); and claim 64 is directed to a DNA molecule homologous or complementary to the sequence of SEQ ID NO:65.

D1 discloses that the presence of P4T8 resulted in high levels of saturated FAC but reduced levels of unsaturated FAC. D1 also discloses a nucleic acid sequence(GenBank 9722522) identical to the sequence shown in SEQ ID NO:65 of the present application.

Thus, the subject-matter of said claims is not novel over D1.

(Continued on Supplemental Box.)

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/MY2011/000003

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Claims 12-22 and 65 do not comply with PCT Rule 6.4(a) which stipulates that multiple dependent claim shall not serve as a basis for any other multiple dependent claim, and claim 23 refers to such claim. However, the search and examination has been carried out.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/MY2011/000003

Supplemental Box
In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient. Continuation of : Box No. V. 2.3 Claim 63 is directed to a DNA molecule associated with FAC homologous or complementary to the sequence of SEQ ID NO:56. D1 discloses a nucleic acid sequence(GenBank GH159182) identical to the sequence shown in SEQ ID NO:56 of the present application. Thus, the subject-matter of said claim is not novel over D1. 2.4 Dependent claims 3-23, 25-30, 43-61 further define the contents of oils in total FAC. However, as regards the parameters of the ratio and the kind of fatty acids, it is obvious to a person skilled in the art that these parameters are obtained by routine experimental means. Therefore, the subject-matter of said claims is not inventive. 2.5 Claims 31-40 are directed to a method for selecting a plant based on FAC of oil by detecting the presence of a genetic marker RD56 (SEQ ID NO:56). D1 discloses that RD56 was mapped in linkage group 15 of interspecific hybrid T128. However, D1 fails to disclose that RD56 is a genetic marker indicative of a plant having a high saturated FAC. Neither D1 nor any of the other documents cited in the search report contains anything that would prompt a person skilled in the art proceeding from the teaching of D1 to arrive at the method defined in claims 31-40. Therefore, the subject-matter of claims 31-40 is considered to involve an inventive step. 3. Industrial Applicability [PCT Article 33(4)] The subject-matter of claims 1-65 is industrially applicable.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 12 - 0064206	
				Bogotá D.C., Junio 25 de 2012 - 17:10:57	
RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.			NI 830.022.145		
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	198888443	25/06/2012	31.482.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	590.000.00	590.000.00	
				\$590.000.00	
=====					
SON: *QUINIENTOS NOVENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***					
Responsable: _____					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 12-124171- -00000-0000 Fecha: 2012-07-24 16:58:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 85					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240 Junio 25 de 2012 - 17:11:09					



No. 12-124171- -00000-0000

Fecha: 2012-07-24 16:58:46 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 85

**LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES**PATENTE DE INVENCION ☐MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

1	☒	Indicación que se solicita una PCT
2	☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
58	☒	Dibujos de ser estos pertinentes
85	☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa	☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐